FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE
ET DE PHARMACIE DE MARSEILLE

15

ACTION DE QUELQUES ANTIMETABOLITES SUR LES NUCLEOTIDES LIBRES AU COURS DE LA GERMINATION DE » PHASEOLUS AUREUS »

Approche biochimique d'un test végétal d'activité tératogénétique

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de Marseille

Le..... Octobre 1967

par

CLAIRE MULLER-DURANTE

Née le 30 Mars 1942 à NICE

Pharmacien
Certifiée d'Études supérieures de Chimie générale
Certifiée d'Études spéciales d'Immunologie et d'Hématologie

pour obtenir le Grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

Examinateurs de la Thèse	M. le Professeur J.C. DUMAZERT	Président
	MM. les Professeurs Ch. GREBUS, J. MERCIER, Ag. Cl. GHIGLIONE	Assesseurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545823_0045

Action de quelques antimétabolites sur les nucléotides libres au cours de la germination de "Phaseolus aureus"

Action de quelques antimétabolites sur les nucléotides libres au cours de la germination de "Phaseolus aureus"

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de Marseille

par

Claire MULLER-DURANTE
Pharmacien
Certifiée d'Études supérieures de Chimie générale
Certifiée d'Études spéciales d'Immunologie et d'Hématologie

IMPRIMERIE NATIONALE DE MONACO, S.A.
— 1967 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

PERSONNEL ADMINISTRATIF

Doyen : H. GASTAUT

Assesseurs : Ch. GREBUS et J. CHARPIN

Attaché Principal, Chef des Services Administratifs : P. MOUCHET.

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs honoraires

MM. MONGES, ROCHE, CHAUVIN, MATTEI, DE VERNEJOUL, GIRAUD, MERCIER, MARONNEAUD, VIGNOLI.

Professeurs titulaires de Chaires

Anatomie	MM. GRISOLI
Anatomie appliqnée et Chirurgie expérimentale	HENRY
Anatomie pathologique	GASTAUT
Bactériologie et Virologie	BRAHIC
Biochimie Médicale	LISSITZKY
Botanique et Cryptogamie	PELLISSIER
Cardiologie Clinique et Expérimentale	JOUVE
Chimie	DUMAZERT
Chimie analytique et hydrologie	PASTOR
Chimie biologique	DERRIEN
Chimie minérale	MOURGUE
Clinique chirurgicale	CARCASSONNE
Clinique chirurgicale	LAMY
Clinique chirurgicale	LENA
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	SALMON
Clinique de chirurgie thoracique	DOR
Clinique dermatologique	HADIDA
Clinique d'endocrinologie	VAGUE
Clinique exotique	BLANC
Clinique médicale	N...
Clinique médicale	AUDIER
Clinique médicale thérapeutique et des maladies du sang	OLMER
Clinique des maladies infectieuses	RAYBAUD
Clinique des maladies des voies digestives et de la nutrition	MONGES H.
Clinique médicale infantile	BERNARD R.
Clinique de neurologie	BOUDOURESQUES
Clinique neuro-chirurgicale	PAILLAS
Clinique obstétricale et gynécologique	CHOSSON
Clinique ophtalmologique	JAYLE
Clinique oto-rhino-laryngologique	APPAIX

Clinique pneumo-phtisiologique	MM.	Charpin
Clinique psychiatrique		Sutter
Clinique rhumatologique		Recordier
Clinique stomatologique		N...
Clinique urologique		Ducassou
Electroradiologie		Legre
Histologie et embryologie		Picard
Histologie et embryologie		Stahl
Hygiène et médecine sociale		Sautet
Médecine expérimentale		Donnet
Médecine légale et médecine du travail		Mosinger
Parasitologie		Ranque
Pathologie chirurgicale		Granjon
Pathologie interne		Mouren
Pharmacie chimique et Législation Pharmaceutique		Cristau
Pharmacie galénique et Matière Médicale		Bernard P.
Pharmacologie pharmaceutique		N.
Physiologie		Morin
Physiopathologie des voies respiratoires		Laval
Physique		Dubouloz
Physique Médicale		Roux
Thérapeutique		Pieri
Zoologie et Microbiologie		Grebus
Toxicologie		Viala

Professeurs titulaires à titre personnel

M. Bourgeon René	Chirurgie
Farnarier	Ophtalmologie
Houel	Chirurgie Thoracique et chirurgie du cœur
Imbert	Chirurgie générale
Jahier	Obstétrique et gynécologie
Mercier Jacques	Pharmacodynamie et biologie humaine
Orsini	Pédiâtrie
Payan	Anatomie Pathologique
Serafino	Chirurgie
Tamalet	Microbiologie
Tissie	Oto-rhino-laryngologie

Professeurs sans Chaire

MM. Depieds, Desanti, Gevaudan, Corriol, Serment.

Maîtres de Conférences - Agrégés

MM. Achard	MM. Dumon	MM. Muratore
Ardisson	François	Nicoli
Arnoux A.	Fournier	Plasse
Baret	Garcin	Raybaud C.
Battesti	Gascard	Reynaud

Bernard P.M.
Bimar
Bouyala
Buisson
Bureau
Carcassonne M.
Claustre
Chevrot
Codaccioni
Combalbert
Courbier
Crevat
Dalmas
Delmont
Dor
Gauthier
Gayte-Sorbier
Giraud F.
Ghiglione
Grimaud
Guerinel
Huguet
Imbert Paul
Mme Jouve
MM. Jullien
Kaphan
Lanza Maurice
Louchet
Mongin
Monties
Richaud
Richelme
Rolland
Salamon
Saracco
Sarles
Seite
Soulayrol
Taranger
Tatossian
Toga
Vitry
Zwirn
Sedan Robert
(1-1-67)

Agrégés en exercice

MM. Berard
Bremond
Bricot
Carcassonne Y.
Casanova
Coignet
Comiti
MM. Gares
Gerard
Jean
Lachard
Michotey
Monges André
MM. Reboud
Ruf
Simonin
Temine
Trifaud

Agrégés libres

MM. Berthier
Bourvet
Chauvin
Devin
Figarella
MM. Gambarelli
Ollivier
Ourgaud
Paoli

A mes parents

en témoignage de ma profonde reconnaissance

A mon Mari

A ma Sœur

A mes Amis

A notre Maître et Président de thèse :

Monsieur le Professeur DUMAZERT

qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude, de notre respectueux dévouement et le témoignage de notre fidèle attachement.

A Monsieur le Professeur Ch. GRÉBUS

qui nous a fait l'honneur de consacrer un peu de son temps si précieux à juger notre travail, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J. MERCIER

Nous le remercions vivement de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de siéger parmi nos juges.

A Monsieur le Professeur Agrégé : Cl. GHIGLIONE

Nous apprecions votre constante bonne humeur, votre grande gentillesse ainsi que vos précieux conseils durant les années passées dans le laboratoire.

Vous avez accepté de juger notre travail, nous vous sommes très reconnaissante.

A Monsieur Vovan

Vous n'avez jamais ménagé ni votre temps ni votre peine pour nous aider à réaliser ce travail.

Nous sommes heureux de vous exprimer notre attachement et notre reconnaissance.

A Robert Itié

Nous vous remercions pour votre amicale collaboration tout au long de ce travail.

A tous nos camarades du laboratoire de Chimie

Nous avons trouvé auprès d'eux un esprit d'équipe et de coopération dont nous tenons à les remercier.

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION 17

EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE

I. — Sur les nucléotides libres des tissus végétaux Nucléotides des germes de Phaseolus aureus..... 19
II. — La colchicine. Chimie et Biologie..... 23
III. — La 6-mercaptopurine. Chimie et Biologie..... 27
IV. — Le Thalidomide. Action tératogénétique..... 30

PLAN DE TRAVAIL 35

RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre I. — Matériel d'étude et techniques..... 37
Matériel biologique
A. — Germination 37
B. — Traitement des germes 38
C. — Fractionnement des nucléotides 39
D. — Concentration et purification des nucléotides 42
E. — Identification des nucléotides 42
F. — Analyse des glucides 44

Chapitre II. — Action de la colchicine, de la 6-mercaptopurine et du thalidomide sur l'aspect morphologique des germes de Phaseolus aureus 45
Influence exercée sur le poids des germes 47

Chapitre III. — Influences exercées par la colchicine la 6-mercaptopurine et le thalidomide sur les nucléotides libres des germes de Phaseolus aureus 48
I. — Sur la teneur des nucléotides totaux 48
II. — Sur la répartition des nucléotides..... 49
A. — Identification des fractions..... 49
B. — Étude des fractions Y et X..... 56

Chapitre IV. — Influences exercées par la colchicine, la 6-mercaptopurine et le thalidomide sur les glucides des germes de Phaseolus aureus 61

EXAMEN D'ENSEMBLE DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS 63

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 67

INTRODUCTION

L'action des médicaments s'exerce par leur contact avec les cellules sensibles de l'organisme. La spécificité d'action sur un organe peut être indépendante de la concentration du médicament en raison même de la sensibilité élective locale, cellulaire. Cette sensibilité physiologique est sans doute basée sur des affinités physico-chimiques entre le médicament et la cellule réceptrice. L'étude d'un médicament exige l'observation puis l'analyse des phénomènes que produit l'introduction dans l'organisme des substances toxiques ou médicamenteuses. Et ceci s'applique non seulement à l'action principale mais aussi aux actions secondaires, quelquefois bénéfiques, quelquefois inutiles ou même dangereuses.

Une première observation générale des phénomènes provoqués se fait déjà au cours des épreuves de toxicité aigue et chronique d'un médicament nouveau lorsque se dessine l'atteinte du système nerveux central, du système cardiovasculaire, des reins, du foie, etc.

Depuis la regrettable affaire du thalidomide, le code de la Santé publique exige l'étude de l'effet tératogénétique pour certains médicaments nouveaux (en général substances chimiques) dans le cadre de l'expérimentation toxicologique de ceux-ci. On sait que cette étude doit être effectuée sur plusieurs générations d'animaux de laboratoire.

Certains auteurs pensent que des tests rapides pourraient donner une orientation sur l'inocuité ou la toxicité d'une substance. Le premier en date de ces tests est celui des protozoaires décrit par Franck et coll. (19). Par la suite, d'autres auteurs préconisent les tests sur microorganismes et surtout les tests végétaux (Madame Oustrin, 35).

L'étude du rôle des nucléotides libres dans le métabolisme intermédiaire a pris ces dernières années une grande ampleur. Aussi bien sur les tissus animaux, sur les tissus végétaux, que sur les microorganismes, on a démontré que l'analyse des corrélations entre le substrat chimique et les manifestations physiologiques d'un tissu peut bénéficier largement de la connaissance des distributions et de l'évolution des nucléotides libres.

Les substances tératogénétiques, antimitotiques ou mitoclasiques entraînent des perturbations du développement et de la division normale des cellules, qu'elles soient animales ou végétales. De ce fait, nous avons pensé que l'étude des nucléotides libres des semences germées sur milieu contenant ces substances pourrait fournir un indice précis sur la toxicité de celles-ci et servirait de tests biochimiques plus probants que ceux basés uniquement sur l'étude morphologique des plantules.

Nous avons choisi pour cette étude trois substances reconnues pour être tératogènes ou mitoclasiques : la colchicine, le thalidomide et la 6-mercaptopurine. Ces composés sont entrés dans la chimiothérapie et leur efficacité a été largement démontrée.

Avant de relater nos recherches, il convient d'exposer les principales données acquises actuellement au sujet de la biochimie des nucléotides libres des tissus végétaux et de la biologie des antimitotiques.

EXPOSÉ BIBLIOGRAPHIQUE

I. — SUR LES NUCLEOTIDES LIBRES DES TISSUS VÉGÉTAUX.

Les nucléotides libres existent dans la cellule vivante, soit isolés, soit associés à des molécules simples ou encore combinés entre eux, formant des oligonucléotides ou des polynucléotides.

Les nucléotides résultent de la combinaison d'une base azotée purique ou pyrimidique, d'un pentose et d'une ou de plusieurs molécules de phosphate.

Les bases sont dérivées du noyau purique et pyrimidique. On trouve dans les produits naturels deux bases puriques : l'adénine et la guanine et deux bases pyrimidiques : l'uracile et la cytosine (Figure 1).

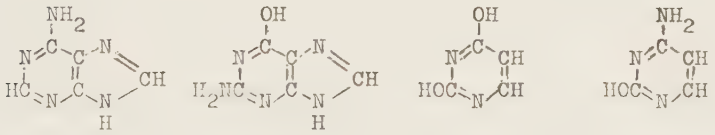


Fig. 1. — *Bases entrant dans la constitution des nucléotides*

Dans les ribonucléotides et l'acide ribonucléique, le pentose est le d-ribose. Le désoxyribose est caractéristique des désoxyribonucléotides et de l'acide désoxyribonucléique.

Les nucléotides peuvent être simples ou conjugués. Dans les *nucléotides simples*, on trouve une molécule d'acide phosphorique liée à l'hydroxyle du pentose en C_2, en C_3 ou en C_5, tandis que le carbone

N° 1 du pentose est lié à l'azote 9 des bases puriques ou à l'azote 3 des bases pyrimidiques, selon les formules I et II de la figure 2 ci-dessous :

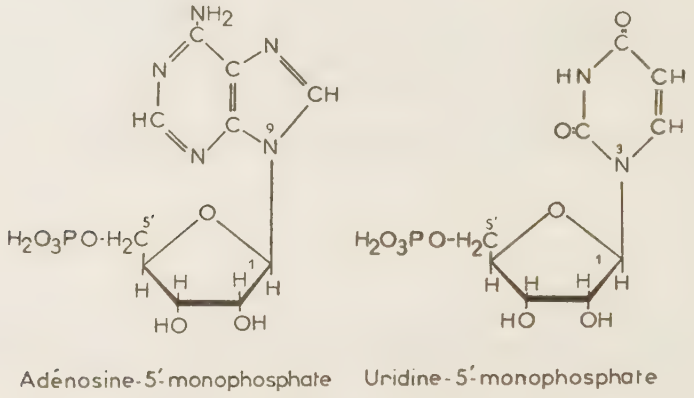


Fig. 2. — *Constitution chimique des nucléotides simples.*

Suivant la nature des bases, on distingue parmi les ribonucléotides, l'adénosine monophosphate, le guanosine monophosphate, l'uridine monophosphate et le cytidine monophosphate.

Les cellules renferment à côté des nucléotides déjà cités, d'autres caractérisés par la présence de deux ou de trois molécules d'acide phosphorique sur le carbone terminal du pentose. On parle ainsi des adénosine- di- et tri-phosphates, des uridine di- et triphosphates, etc...

Les *nucléotides conjugués* résultent de la condensation sous forme d'anhydride d'un ribonucléotide et d'un groupement à fonction acide tel que le glucose-1-phosphate, un aminoacide, la phosphorylcholine.

Les groupements ainsi liés aux nucléotides se trouvent sous une forme particulièrement active; ils peuvent être transférés sur un accepteur et prendre part à d'autres réactions. Ces anhydrides de nucléotides ont été parfois appelés « nucléotides coenzymes ». En effet, certains d'entr'eux participent à une suite de réactions, au cours desquelles ils sont constamment transformés et régénérés. Dans l'état actuel de nos connaissances il convient d'appeler ces composés « intermédiaires actifs ».

Il est à noter qu'à ce titre les nucléotides d'uracile, de cytosine et de guanine, à l'égal des nucléotides d'adénine sont capables de former avec différents radicaux à fonction acide des composés capables de participer au transfert de ces radicaux sur un accepteur.

Nous rapporterons dans le tableau I les principaux nucléotides et leur abréviation courante.

Le qualicatif de *nucléotides libres* qu'on accorde à certains nucléotides permet de distinguer ces derniers des composés similaires incorporés dans les macromolécules.

L'étude systématique de la composition des différents tissus et microorganismes en nucléotides libres a pu être entreprise grâce à la mise au point de nouvelles méthodes d'analyse très sensibles de chromatographie sur changeur d'ions. C'est ainsi que plusieurs tissus (foie, muscles, cerveau, glandes endocrines), certains microorganismes (levu-

Tableau I. — Principaux nucléotides et leur abréviation courante.

Base Substituant sur le C5 du pentose	*Dénomination*	*Abréviation*
ADÉNINE		
-P	Adénosine monophosphate	AMP
-P-P	Adénosine diphosphate	ADP
-P-P-P	Adénosine triphosphate	ATP
GUANINE		
-P	Guanosine monophosphate	GMP
-P-P	Guanosine diphosphate	GDP
-P-P-P	Guanosine triphosphate	GTP
-P-P-mannose	Guanosine diphosphate-mannose	GDPM
-P-P-ose	Guanosine diphosphate-ose	GDPO
CYTOSINE		
-P	Cytidine monophosphate	CMP
-P-P	Cytidine diphosphate	CDP
-P-P-P	Cytidine triphosphate	CTP
-P-P-choline	Cytidine diphosphate-choline	CDPCh
URACILE		
-P	Uridine monophosphate	UMP
-P-P	Uridine diphosphate	UDP
-P-P-P	Uridine triphosphate	UTP
-P-P-glucose	Uridine diphosphate glucose	UDPG
-P-P-galactose	Uridine diphosphate galactose	UDPGal
-P-P-arabinose	Uridine diphosphate arabinose	UDPArb
-P-P-xylose	Uridine diphosphate xylose	UDPXyl
-P-P-acide uronique	Acide uridine diphosphate uronique	UDPUr
-P-P-acétyl-galactosamine	Uridine diphosphate N acétyl galactosamine	UDPAGal
-P-P-acétyl-glucosamine	Uridine diphosphate N acétyl glucosamine	UDPAG

Autres nucléotides :

Nicotinamide adénine dinucléotide	NAD
Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate	NADP
Flavine adénine dinucléotide	FAD
Acide inosinique	IMP

res, bactéries), certains liquides biologiques (sang, lait) et quelques tissus végétaux ont été analysés avec succès.

Les travaux sur les nucléotides libres des végétaux supérieurs sont de date récente. Les recherches originales d'Albaum (1) sur l'isolement de l'adénosine triphosphate à partir des germes de *Phaseolus mungo* ont ouvert la voie à de nombreuses investigations. Le grand mérite de cet auteur a été de découvrir un matériel d'étude qui se prête particulièrement bien à ce genre d'analyse. En effet, les germes de *Phaseolus mungo* renferment relativement peu de polysaccharides, d'acide phytique et de substances non nucléotidiques absorbant fortement dans l'ultra-violet. Des travaux importants sur les nucléotides des tissus végétaux sont rapportés pour la première fois par Ginsburg et coll. (23). Les analyses de ces auteurs portent sur les germes de *Phaseolus aureus*, de source commerciale (variété voisine de Phaseolus mungo).

Plus tard, Bergwist (3) décrit l'identification des nucléotides triphosphates dans les germes de blé.

Rowan (39) isole des bananes, l'uridine diphosphate glucose et des traces d'uridine diphosphate galactose.

Dans les germes de cinq jours de *Phaseolus vulgaris*, Sebesta et coll. (41) identifient les nucléosides mono- et tri-phosphates d'adénine, de guanine et d'uracile et l'uridine diphosphate glucose.

Mori et coll. (33) étudient les nucléotides à différents stades de germination des tubercules de pommes de terre. Brown (7) se propose de déterminer dans les graines de petits pois les teneurs en nicotinamide-adénine-dinucléotides sous leur forme oxydée et réduite. Selon l'auteur, la forme réduite prédomine dans ce matériel.

Toutes ces recherches sont effectuées sur un organe déterminé de la plante ou conduites d'une manière statique. Une récente étude de Vovan (48) aborde d'une manière systématique la répartition des nucléotides libres des germes de *Phaseolus aureus* ainsi que leur évolution au cours de la germination.

Nucléotides des germes de Phaseolus aureus.

Les recherches de Vovan, réalisées à l'instigation de C. Dumazert sur la répartition des nucléotides libres dans les germes de Phaseolus aureus ont montré la présence dans ce végétal :

— des nucléosides mono-, di- et tri-phosphates d'adénine, d'uracile, de cytosine et de guanine;

— des nucléotides conjugués dérivés de la guanosine : guanosine diphosphate-mannose et guanosine diphosphate-ose (le sucre n'a pu être identifié d'une manière certaine);

— des nucléotides conjugués dérivés de l'uridine : uridine diphosphate-N-acétyl-glucosamine, uridine diphosphate-N-acétyl-galactosamine, uridine-diphosphate-glucose, uridine diphosphate-galactose, uridine diphosphate-arabinose, uridine diphosphate-xylose, les acides uridine-diphosphate-uroniques;

— des nucléotides dérivés de la nicotinamide : nicotinamide adénine dinucléotide et nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

Sur le plan quantitatif, on note le taux particulièrement élevé des uridines diphosphates oses (UDPO). Si l'on considère les nucléotides

d'après la nature de leur base, on remarque que l'ensemble des nucléotides libres des germes de *Phaseolus aureus* est dominé par les dérivés adényliques (35 p. 100) et les dérivés uridyliques (40 p. 100).

En ce qui concerne l'évolution des nucléotides au cours de la germination, on note une augmentation rapide de l'UDPO à partir du premier jour pour atteindre le maximum au bout de deux jours puis une diminution à partir de ce stade. Cela traduit l'intensité de l'activité métabolique à différentes périodes de l'ontogénèse du végétal. On remarque également qu'au moment où l'activité métabolique se ralentit, l'ATP s'accumule. Les variations respectives des uridine-diphosphate-oses et du système ADP/ATP au cours de la germination sont significatives et fournissent un indice utile concernant le métabolisme des glucides.

Ainsi a pu être établie une corrélation entre l'évolution des nucléotides-oses et celle des polyholosides au cours de la germination et précisé le rôle des premiers dans le métabolisme des secondes.

A partir de la réserve métabolique soluble résultant de la dégradation de l'amidon, se constituent les intermédiaires actifs sous forme de nucléotides-oses. Ces derniers interviennent à la fois dans les réactions d'interconversion en donnant naissance à des unités glucidiques diverses, et comme donateur des groupements glucosyl dans la biosynthèse des polysaccharides des parois cellulaires.

II. — LA COLCHICINE

Chimie et Biologie

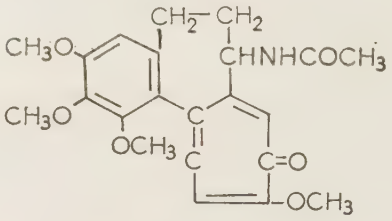
La colchicine est un principe extrait du bulbe et du tégument des graines de *Colchicum autumnale*, le colchique. Le nom colchique provient de ce qu'il était fort commun en Colchide, région située à l'Est de la Mer Noire et faisant aujourd'hui partie de l'URSS. Le colchique est une liliacée qui croit dans les prairies de l'Europe centrale et méridionale. Utilisé depuis très longtemps, puisque Dioscoride l'employait contre la goutte, il fut introduit dans la thérapeutique en 1763 sous les espèces de son bulbe et de ses semences. On a utilisé aussi les fleurs. Seules les semences restent employées.

Les semences sont subglobuleuses, brun foncé, de 2 mm de diamètre. Elles ont une surface grossièrement ponctuée, marquée d'un épaississement charnu autour du hile. Elles n'ont pas d'odeur et sont de saveur amère. Elles se récoltent à maturité du fruit.

Le bulbe renferme 0,08 à 0,2 p. 100 de colchicine et se récolte en Septembre.

La colchicine est une substance azotée dont la formule brute établie par Zeisel est $C_{22}H_{25}NO_6$. Elle fut découverte en 1820 par Pelletier et Caventou. Il faut attendre 1886 pour connaître l'alcaloïde pur et

quelques-uns des produits de dédoublement. En 1924, Windaus lui donna la formule développée suivante :



Elle est extraite des semences par l'alcool à 96°. Les liqueurs alcooliques laissent, après distillation, un résidu qui se sépare en deux couches. La couche supérieure, huileuse, est agitée avec une solution d'acide tartarique qui dissout la colchicine. Cette solution acide est filtrée, puis agitée avec du chloroforme qui s'empare de la colchicine et l'abandonne par évaporation à l'état de combinaison moléculaire contenant deux molécules de chloroforme. L'alcaloïde impur est repris par un mélange de chloroforme et d'éther de pétrole qui, après évaporation, fournit la colchicine cristallisée.

La colchicine officinale est jaunâtre, gommeuse, non cristallisée, inodore.

Elle a une saveur amère très persistante. Elle fond à 145°C avec décomposition à 142°. Elle est soluble dans l'eau, moins à chaud qu'à froid. Elle est très soluble dans l'alcool et le chloroforme froid, mais peu soluble dans l'éther et dans le benzène. Elle est insoluble dans l'éther de pétrole. Son pouvoir rotatoire est : $[\alpha]\ D = \pm\ 121^{\circ}$ (c = 0,9 p. 100, $CHCl_3$). Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet possède deux maximum à $\lambda = 243$ mμ et à $\lambda = 350$ mμ.

Sa solution aqueuse est légèrement alcaline au tournesol. Elle y est facilement dégradée et donne la colchicéine.

Action physiologique et thérapeutique de la colchicine.

La colchicine a des actions toxiques différentes suivant l'espèce animale : la grenouille et plus généralement les animaux à sang froid sont indifférents alors que les animaux à sang chaud sont très sensibles. Cela tiendrait au fait que les premiers ne peuvent transformer la colchicine en oxycolchicine alors que les seconds l'oxydent facilement.

Son action principale et la plus nette se manifeste sur le tube digestif. C'est un émétocatarthique violent qui agit quelle que soit la voie d'introduction. On observe chez le chien des selles diarrhéiques précipitées, nombreuses, fétides et à la fin sanguignolantes, avec ténesme et violentes coliques. Les symptômes de l'intoxication par les préparations de colchique et par la colchicine sont donc ceux d'une gastroentérite aigue. Dans les observations des cas mortels on relève des ulcérations gastriques et intestinales. Ce n'est qu'à dose toxique que la colchicine agit, après plusieurs heures, sur le système nerveux central et provoque une prostration profonde en même temps que la dilatation pupillaire accompagnée de céphalées et de sueurs froides.

Par voie sous-cutanée la colchicine agit sur les nerfs sensitifs et produit une anesthésie légère. Son action sur la fibre musculaire striée rappellerait celle de la vératrine.

La dose mortelle pour l'Homme est voisine de 8 mg. Elle s'éloigne suffisamment des doses thérapeutiques. En effet, la colchicine, efficace contre la goutte, est employée sous forme de granules à 0,5 ou 1 mg. La dose maximum est de 2 mg en une fois et de 4 mg par 24 heures. La colchicine agit très lentement et a une tendance à l'accumulation. La colchithérapie reste à l'heure actuelle une médication de choix dans les accès de goutte. Son mécanisme d'action est encore inconnu.

Action cytoclasique de la colchicine.

De la colchicine, C. Mangenot écrivait dans son étude sur les substances cytoclasiques et les cellules végétales, qu'elle apparaissait comme une substance dont le pouvoir mitoclasique est incomparable. Cet alcaloïde provoque, soit dans les tissus des tumeurs, soit dans les zones germinatives des tissus normaux, une action d'arrêt ou d'inhibition de la cinèse affectant les deux phases terminales : la métaphase et l'anaphase. De plus, ce blocage cytotoxique est probablement précédé d'une phase excitomitotique de durée et d'intensité variable suivant la concentration de l'alcaloïde, la nature du tissu et de la tumeur. La lésion élémentaire et constante de la cellule consiste essentiellement en une dégénérescence anaplasique des fibres du fuseau chromial, qui se transforme en une masse acidophile dépourvue de polarité, sans structure fibrillaire, ni chondriosomes, incapable par la suite de provoquer la migration des chromosomes.

A côté de cette lésion essentielle, peut se manifester une hypertrophie des nucléoles, et plus encore, une pycnose du noyau, empêchant dès la prophase, l'individualisation des chromosomes.

Ces troubles de la cinèse s'établiraient d'après Dustin (15) de 4 heures à 24 heures après l'absorption du poison caryoclasique.

On a constaté que les graines de Datura plongées dans les solutions diluées de colchicine produisaient des plantes géantes.

Derman et Diller (12) traitent les bourgeons des plantules de chataignier (Castanea deutata, C. Molissima et C. crenata) avec une solution à 5 p. 1000 de colchicine. Ils constatent que 58 p. 100 des bourgeons qui résistent à ce traitement sont tétraploïdes.

Cette polyploïdie est constatée également chez les semences germées de framboise sur lesquelles on a pulvérisé une solution de colchicine (Halder et coll., 26).

Sen et coll. (42) parviennent à induire la polyploïdie dans quatre variétés de soja, soit en agitant les semences dans une solution à 0,1 ou 0,25 p. 100 de colchicine pendant 3 à 24 heures, soit en traitant le bourgeon apical des semences germées avec la colchicine.

Les expériences de Mergen et coll. (32) sur les semences de neuf espèces d'*abies* montrent que, traitées par la colchicine, plusieurs deviennent polyploïdes et meurent avant deux ans.

Au cours de la culture des cellules de l'espace internodal de *Nitella flexilis*, on constate que l'acide adénylique favorise la formation des racines et des rhizômes tandis que la colchicine stimule l'élongation de ces organes.

A côté de l'induction de la polyploïdie chez les organes jeunes des plantes, la colchicine peut conduire à la réduction chromosomique somatique. Chez les semences de sorgho traitées par la colchicine, Damon (9) constate un arrêt de la division cellulaire à la métaphase; l'effet de cet alcaloïde est plus marqué chez les homozygotes que chez les mutants. Simantel et coll. (43) pensent que cette particularité est due à la réduction chromatique chez les semences traitées par la colchicine. C'est ainsi que Simantel et Ross (45) obtiennent par le même traitement, l'induction d'une plantule mutante aploïde. Ils indiquent qu'il s'agit d'un chromosome complémentaire entier provenant du processus de réduction chromatique dont le mécanisme consiste en une série de divisions englobant la disjonction et la sélection ou la cassure des gènes.

Etudiant l'action de la colchicine sur les tissus animaux, Panuccio (36) démontre que le traitement par 0,025 mg de colchicine par jour pendant un mois chez le Rat albinos, avant l'administration du méthylcholanthrène (substance cancérogène), prolonge le temps de latence du développement de la tumeur. L'auteur pense que la colchicine agit sur le système mésenchymateux et sur les glandes endocrines. Par contre ce traitement augmente consisérablement la malignité de la tumeur.

Action biochimique de la colchicine.

1. — *Sur les tissus végétaux.* — L'action de la colchicine sur la composition chimique du cytoplasme est étudiée par Fursov et coll. (21). Ces auteurs traitent les semences de blé avec une solution à 0,01 p. 100 de colchicine (les témoins sont traités dans les mêmes conditions avec l'eau) pendant 24 heures et font germer pendant 3, 6 et 10 jours. La colchicine active le métabolisme de l'acide nucléique et des protéines ainsi que la division cellulaire des organes embryonnaires. L'action de la drogue sur la structure de la cellule et sur celle des noyaux est la même, avec toutefois une sensibilité plus marquée pour les cellules en cours de division. Les auteurs ont étudié également l'accumulation des acides nucléiques et des protéines dans les deux lots de semences (lot traité par la colchicine et lot témoin) et ils démontrent l'action stimulante de l'alcaloïde sur le métabolisme dans les tissus embryonnaires.

Charkraborty et Biswas (8) tentent d'expliquer le mécanisme d'action de la colchicine. A cet effet, les bulbes d'oignon sont mis à germer pendant 48 heures dans l'eau. On coupe les racines à 1 ou 2 cm de l'extrémité et après lavage à l'eau distillée glacée, on trempe les méristèmes des racines néoformées dans une solution à 0,05 p. 100 de colchicine. Au bout de 46 heures, on observe le développement des tumeurs (Ce développement est inhibé par une solution à 0,01 p. 100 d'ATP).

Utilisant le phosphore radioactif, ces auteurs ont montré, par rapport aux témoins, que la radioactivité augmente considérablement dans la fraction acido-soluble dans les bulbes traités par la colchicine. Cette radioactivité est observée surtout dans les dérivés adényliques (AMP, ADP et ATP). Ils notent, par contre, une diminution des nucléotides pyrimidiques.

L'effet de la colchicine sur le métabolisme des hydrates de carbone a été étudié sur les formes mycéliales des espèces de *Cunninghamella* par Salama et Naguib (40).

A la concentration de 20 p.p.m., ils n'ont pas observé d'action sur le poids sec. A cette concentration, la colchicine fait accroître la teneur en glucides tandis que la teneur en gaz carbonique n'augmente qu'à la concentration de 10 p.p.m. La colchicine, en petites quantités, agirait comme une hormone activant la phosphorylation des oses et les processus enzymatiques. L'augmentation des polysaccharides intéresse particulièrement les glucosanes et les pentosanes ainsi que les pentoses conjugués. Ceci suggère une accumulation rapide des nucléosides monophosphates.

Sur le même matériel, Naguib et Salama remarquent (34) que l'absorption du phosphore par les mycéliums est fortement augmentée si on ajoute au milieu de culture 10 p.p.m. de colchicine. Par contre la concentration de 20 p.p.m. réduit la quantité de phosphore absorbé.

2. — *Sur les animaux.*

L'influence de la colchicine sur le métabolisme intermédiaire observée chez les végétaux a été également étudiée chez les animaux.

Wang et coll. (49) injectent de la colchicine aux rats normaux et hépatectomisés. Ils observent parmi les nucléotides acido-solubles des foies, une augmentation de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et d'adénosine monophosphate (AMP) et une diminution des nucléosides triphosphates (ATP, GTP et UTP).

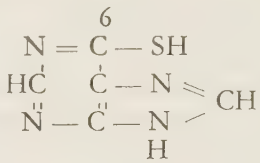
L'incorporation des précurseurs dans l'acide ribonucléique est influencée par l'administration de la colchicine. En effet, Weinfeld et Sandberg (50) injectent par voie sous-cutanée 1 à 1,1 mg de colchicine par kilogramme aux rats adultes 16 à 18 heures avant l'administration de précurseurs radioactifs de l'acide nucléique. Ils notent alors une élévation de l'activité spécifique des fractions pyrimidiques et puriques des acides ribonucléiques du foie. Les variations les plus marquées sont observées sur les fractions cytidyliques après injection de l'acide orotique marqué et de l'uridine ^{14}C, et de la fraction guanylique après administration de l'adénine et de l'inosine marqués. Lorsqu'on injecte la xanthine radioactive, l'activité spécifique de la fraction guanylique est doublement accrue. Les auteurs pensent que la colchicine activerait la réaction d'amination dans le foie : l'uridine nucléotide est converti en cytidine nucléotide tandis que la xanthine-5-phosphate est transformée en guanosine-5-phosphate.

III. — LA 6-MERCAPTOPURINE

Chimie et Biologie

La 6-mercaptopurine se prépare à partir de l'hypoxanthine par action du pentasulfure de phosphore. Elle a pour formule brute

$C_5H_4N_4S$. Sa formule développée est la suivante :



Elle se présente sous forme de cristaux jaunes solubles dans 100 parties d'eau bouillante. Son spectre d'absorption dans l'ultra-violet possède un maximum à $\lambda = 325$ mμ à pH 1 et à $\lambda = 312$ mμ à pH 11 (figure 3).

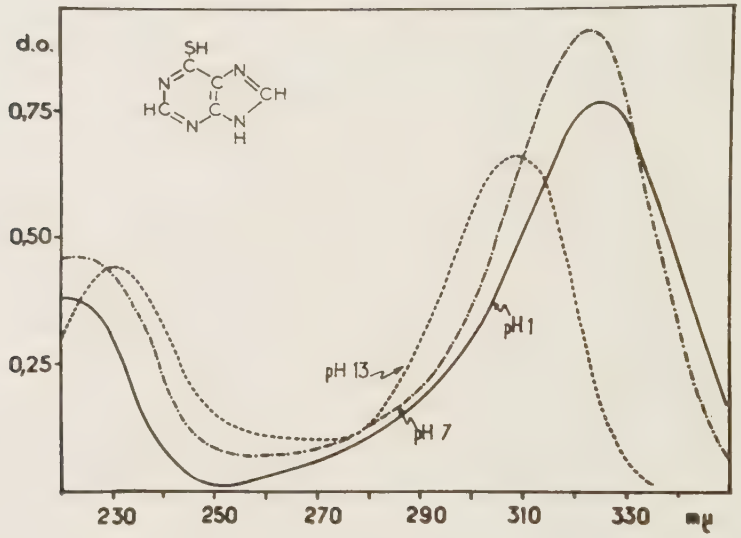


Fig. 3. — Spectres d'absorption dans l'ultra-violet de la 6-mercaptopurine

La propriété essentielle de cette substance est d'être un analogue chimique de l'adénine et de l'hypoxanthine, constituants des acides nucléiques et à ce titre, on la classe parmi les antimétabolites, inhibiteurs de l'incorporation des bases puriques dans les acides nucléiques.

Elle est active dans les leucémies aigues de l'enfant et la leucémie myéloïde chronique. Elle est administrée en général par voie orale à la dose 2,5 à 5 mg par kilogramme et par jour pendant plusieurs semaines. Elle est plus connue en thérapeutique sous le nom de purinéthol.

Elle est métabolisée dans le sang en donnant l'acide 6-thiourique.

Elle provoque des ulcérations buccales et des troubles intestinaux. A fortes doses, on note l'apparition d'une thrombocytopénie, une leucopénie, une anémie et même une nécrose hépatique.

Action biochimique de la 6-mercaptopurine.

Chez le *Lactobacillus casei*, Elion et Hitching (17) ont montré que la 6-mercaptopurine se comporte comme un antagoniste de la purine. Cette substance inhibe le développement du microorganisme dans

un milieu de culture contenant de l'acide folique. Ce développement est rétabli lorsqu'on incorpore dans le milieu des purines naturelles : adénine, guanine, xanthine ou hypoxanthine. Par contre, un mutant de L. Casei résistant à la 6-mercaptopurine n'utilise pas l'hypoxanthine et utilise faiblement l'adénine. Selon ces auteurs, il semble que la 6-mercaptopurine interfère dans la conversion de l'adénine en guanine en passant par l'hypoxanthine et que le mutant ne possède pas d'équipement enzymatique pour transformer l'hypoxanthine en guanine. Il est capable, par contre, de désaminer l'adénine. On aura le schéma suivant :

Adénine ⟶ Hypoxanthine —H⟶ Guanine

Elion et Balis (16) indiquent, en outre, que L. casei peut utiliser quelques unes des purines physiologiques pour le développement et l'interconversion des restes puriques en des constituants adényliques et guanyliques des acides nucléiques (AdARN et GuARN). En effet, si le milieu de culture renferme un mélange composé d'une partie d'adénine et de deux parties d'hypoxanthine, il se forme 56 p. 100 d'AdARN et 78 p. 100 de GuARN à partir de l'hypoxanthine. Si on ajoute de la 6-mercaptopurine dans le milieu de culture, seuls 18 p. 100 d'AdARN et 34 p. 100 de GuARN sont formés à partir de l'hypoxanthine; le reste provenant de l'adénine.

Confirmant les travaux de Elion et de Balis, Skipper (44) montre que la 6-mercaptopurine empêche l'utilisation de l'hypoxanthine pour la synthèse des purines de l'acide nucléique dans les tissus intestinaux de la Souris.

Il est intéressant de noter la facilité avec laquelle la 6-mercaptopurine se substitue comme substrat dans les réactions enzymatiques concernant le métabolisme des purines. C'est ainsi que la 6-marcaptopurine est rapidement oxydée par la xanthine-oxydase en acide 6-thiourique. En présence de désoxyriboside-1-phosphate, elle a servi de substrat pour la nucléoside-phosphorylase : il se forme de la 6-mercaptopurine-désoxyriboside (Friedkin, 20).

On remarque que la 6-mercaptopurine exerce une action toxique plus élevée sur les tumeurs que sur les tissus normaux. On pense que cela est dû à la biosynthèse plus accélérée des acides nucléiques dans le tissu tumoral.

En bref, bien qu'il reste beaucoup de points à élucider, nos connaissances actuelles indiquent que la 6-mercaptopurine interfère avec les restes purines soit dans la biosynthèse de l'acide nucléique, soit dans la formation de quelques coenzymes essentiels contenant des bases puriques.

Action tératogénétique de la 6-mercaptopurine.

La 6-mercaptopurine inhibe non seulement le développement de Lactobacillus casei, mais aussi le développement de l'embryon de *Rana pipiens*, surtout d'embryon de grenouille à l'état de dénutrition; les embryons atteints présentent une microcéphalie et un développement insuffisant.

Zunin et Borrone (51) provoquent, en injectant ce produit par voie intrapéritonéale aux rates gravides, des malformations des foetus. Les effets dépendent des doses utilisées et de la période de l'embryo.

génèse. C'est ainsi que chez les animaux ayant reçu 50 mg par kilogramme pendant la période du deuxième au neuvième jour de la gestation, les foetus présentent un retard à la croissance osseuse et l'ipsomie (*) On pense que ce phénomène est dû à l'interférence de la 6-mercaptopurine dans la synthèse des acides nucléiques.

Chez les animaux ayant reçu 12,5 mg/kg/jour durant la période allant du 5e au 9e jour de la gestation, l'hydrocéphalie est observée chez les foetus. La même malformation est également remarquée soit chez les mères gravides carencées en acide folique, soit après addition des antifoliques dans le régimes alimentaires des gestantes. La 6-mercaptopurine agirait alors comme un anti-folique.

Parmi d'autres malformations congénitales, on note la cécité, la microphtalmie. On sait que l'œil est un organe sensible aux agents tératogènes. Ce fait est rapproché de l'expérience fameuse de Hale qui en 1935 a remarqué de telles malformations chez les porcelets nés de mères soumises à un régime carencé en vitamine A au début de leur gravidité. Un régime pauvre en acide panthoténique provoque les mêmes effets.

De cette brève étude de l'action de la 6-mercaptopurine, il ressort que cette substance agit comme un antagoniste des bases puriques et interfère ainsi dans le métabolisme des acides nucléiques et comme un antagoniste de l'acide folique. Par ces deux actions, elle se montre très efficace dans le traitement des leucoses aigues.

IV. — LE THALIDOMIDE

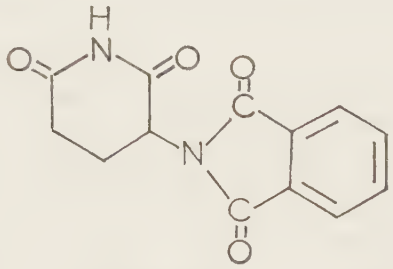
Action tératogénétique

L'activité tératogène de certains médicaments par les substances cytoclasiques utilisées dans le traitement des affections malignes et principalement des hémopathies a été observée d'une manière fréquente. Beaucoup d'entre eux sont en effet, des antimétabolites et leur action est fondée sur cette propriété. Tels sont les corps à activité antifolique et ceux à activité antipurine (6-mercaptopurine).

L'administration du purinéthol, du bisulfan à des femmes enceintes a parfois entrainé un accouchement prématuré. Ces possibilités restent néanmoins limitées du fait même des indications des médicaments en cause. Mais si le médicament tératogène a, au contraire, l'ample diffusion d'un sédatif, par exemple, le risque est accru d'autant et peut être catastrophique. C'est ce que l'on vient constater avec un médi-

(*) Par le terme ipsomie, on désigne un développement inférieur à la normale bien que le foetus soit arrivé à terme.

cament hypnotique et sédatif et dont le principe actif est *l'imide de l'acide N-phtalyl-glutamique ou thalidomide* (formule ci-dessous).



α — *phtalimidogltarimide* (*thalidomide*)

Il se présente sous forme d'une poudre blanche fondant à 269°-271°C, soluble dans le dioxane, le diméthylformamide et la pyridine.

En thérapeutique, le thalidomide est utilisé comme sédatif à la dose de 12,5 à 25 mg et comme hypnotique à la dose de 50 à 200 mg, administré par voie orale.

La série tragique des malformations observées en clinique humaine au cours des années 1959 à 1962, à la suite d'absorption de ce médicament par les femmes enceintes (à certaines périodes de la gestation) a brutalement révélé son action tératogène, et pose, à juste titre, la nécessité formelle d'une recherche expérimentale des éventuels effets tératogènes des médicaments nouveaux.

Chez les Mammifères, certaines espèces sont très sensibles au pouvoir tératogène du thalidomide (Homme, Lapin, et Tatou), d'autres le sont moins (Souris) et d'autres enfin, extrêmement peu (Rat). Brent (5) se demande s'il existe une relation entre la résistance et le métabolisme particulier du thalidomide chez une même espèce. Chez le Chien, Delatour et coll. (10) ont montré que 60 mg/kg de thalidomide, administré per os du 10e au 25e jour de la gestation, provoque la mort in utero de tous les foetus en voie de développement.

Divers travaux récents tentent d'expliquer le mécanisme d'action du thalidomide. L'on se demande si l'activité tératogène de ce produit doit elle être rapportée à sa molécule elle-même ou à l'un de ses métabolites?

L'instabilité du thalidomide à pH supérieur à 6 laisse penser a priori qu'il est rapidement transformé dans l'organisme. Cependant différents travaux prouvent qu'il n'en est rien :

a) après administration par voie digestive, la concentration maximale du thalidomide dans le sang et dans le cerveau est atteinte rapidement chez le Rat et il s'agit du produit intact (Mc Kenzie et Mc Groth, 28);

b) le thalidomide traverse la barrière placentaire : avec la substance marquée au C14, la radioactivité est identique chez les nouveaux-nés et les foetus que chez la mère (Beckman et coll., 2). Cette étude a été effectuée chez le Rat et la Souris.

c) après administration du thalidomide marqué au C14 à des Lapines fécondées, on trouve dans les blastocytes prélevés le 10e jour de la gestation, des produits radioactifs représentés pour 70 p. 100

environ de thalidomide lui-même, pour 12 p. 100 par l'α (o. carboxybenzamido) glutarimide, le reste étant constitué par les acides phtalimido-2 et 4-glutaramique, l'acide phtalimido-2-glutarique et l'acide phtalique, ces deux derniers métabolites à l'état de traces. (Fabro et coll., 18).

Si la responsabilité de la molécule de thalidomide lui-même parait certaine dans l'activité tératogène, on est beaucoup moins sûr en ce qui concerne ses métabolites.

Cependant le fait que la sensibilité de l'animal vis-à-vis du pouvoir tératogène de ce médicament varie d'une espèce à l'autre, doit soulever l'hypothèse des différences dans son métabolisme.

La comparaison des métabolites du thalidomide chez le Rat d'un côté et chez l'Homme et le Lapin de l'autre, aboutit aux conclusions actuelles suivantes :

Selon Smith et coll. (47), chez ces trois espèces, les deux mêmes métabolites essentiels sont retrouvés dans l'urine : La N-phtalyl-isoglutamine et un dérivé de l'acide hydroxy-3-phtalique.

Selon Beckmann (2), chez l'Homme et chez le Rat, on trouve dans les urines les mêmes métabolites au nombre de huit. Seule leur proportion diffère; le métabolite le plus abondant étant la N-phtalyl-isoglutamine chez l'Homme et la N-phtaloyl-glutaride chez le Rat.

Enfin, on a remarqué que la plupart des métabolites du thalidomide sont dérivés de l'acide glutamique. Fabro et coll. (18) ont étudié l'action de ces métabolites sur les enzymes impliqués dans le métabolisme du glutamate : glutamine-synthétase, glutamine-décarboxylase et glutamine-déshydrogénase du cerveau de Rat. Ces auteurs ont montré que des neuf métabolites étudiés, seul l'acide 2 (o-carboxybenzamido) glutarique inhibe l'action de ces trois enzymes.

Action biochimique du thalidomide.

Partant de l'hypothèse que les effets tératogènes du thalidomide pourraient être produits, chez les animaux, par des interférences métaboliques, Frank et coll. (19) dans un mémoire relatif à la toxicité du thalidomide vis-à-vis des protozoaires, ont décrit un test pratique qui peut permettre d'étudier les actions secondaires éventuelles des substances médicamenteuses.

Après avoir déterminé la toxicité du thalidomide sur la croissance des flagellés photosynthétisants, ils montrent qu'un mélange vitaminique renfermant thiamine, panthoténate de calcium, riboflavine, cyanocobalamine, acide nicotinique agissait comme antagoniste de cette toxicité et que l'acide nicotinique en était l'agent actif.

Le thalidomide pourrait donc interférer dans les oxydations cellulaires avec l'utilisation de l'amide nicotinique synthétisé à partir de l'acide nicotinique. En transposant ces résultats chez l'Homme, on pourrait émettre l'hypothèse que le thalidomide interférant avec les oxydations cellulaires à un certain stade initial de la morphogénèse provoquerait alors des anomalies.

Rares sont les travaux relatifs à la toxicité du thalidomide sur les végétaux. Bonney (4) décrit la croissance anormale des spores d'une algue marine rouge traitée par le thalidomide, A la dose de 0,1 g par litre, les résultats montrent que cette substance a deux effets marqués

sur le développement des spores : le premier est une inhibition générale de la croissance (le nombre de spores inhibés est proportionnel à la concentration du thalidomide); le second effet consiste en l'induction d'un nombre significatif de formes anormales des spores au cours du développement.

Etudiant l'action du thalidomide sur les méristèmes radiculaires d'*Allium cepa*, Giacomello et coll. (22) ont montré qu'à la dose de 0,5 à 2,5 p. 100, cette substance n'a pas d'effet significatif sur la fréquence des mitoses, qui reste égale à celle des témoins. Par contre, ils ont trouvé chez les bulbes d'oignon traités des anomalies chromosomiques caractéristiques des dérivés phtaliques. Ces derniers composés agissent comme inhibiteurs de croissance.

Selon Parups et Hoffmann (38), seuls *Lipidium* et *Linum* accusent un léger retard de la germination à la dose de 6×10^{-3} M de thalidomide; quelques cultures de racines isolées de linum toutefois ont permis de mettre en évidence un retard significatif à cette même dose.

Plus récemment, Madame Oustrin (35) étudie l'action du thalidomide sur la culture des racines isolées de *Raphanus sativus*. Quatre cents explantats excisés ont été mis successivement en culture aseptique de 21 jours pour série de 50 environ. Les conclusions de cet auteur ont été les suivantes :

— le seuil toxique du thalidomide sans amide nicotinique, se situe entre 5×10^{-5} et 10^{-4}. A 10^{-3}, la croissance de la racine principale est stoppée vers le 10e jour et souvent, on remarque que les racines secondaires continuent leur développement jusqu'à la 3e semaine.

— les témoins sans amide nicotinique ont une croissance normale bien que l'axe principal soit légèrement moins développé qu'avec l'amide nicotinique;

— l'amide nicotinique agit comme un antagoniste du thalidomide. Aux doses toxiques de ce dernier, il permet une croissance plus grande de l'axe principal comme des racines secondaires.

De l'étude bibliographique, il ressort que les trois substances : colchicine, 6-mercaptopurine et thalidomide, malgré leur différence constitutionnelle et leur utilisation dissemblable en thérapeutique, présentent un point commun du point de vue biochimique : elles interviennent dans le métabolisme des composés nucléiques : nucléotides et acides nucléiques. Cela se conçoit aisément car se sont, soit des antimitotiques (6-mercaptopurine), soit des mytoclasiques (colchicine), soit des tératogénétiques (thalidomide), c'est-à-dire des composés dont l'action se porte préférentiellement sur les cellules en cours de mitose, où le métabolisme est très intense.

Nous avons vu, d'autre part, que les semences de *Phaseolus aureus* germées offrent un matériel de choix pour l'étude des nucléotides libres et de la participation de ceux-ci dans le métabolisme intermédiaire.

Il nous a paru alors intéressant de rechercher les effets de la colchicine, de la 6-mercaptopurine et du thalidomide, incorporés dans le milieu de culture, sur les nucléotides libres des germes de *Phaseolus aureus*. Nous envisageons ainsi la possibilité d'un test végétal pour étudier les effets secondaires de certains médicaments chimiques.

PLAN DU TRAVAIL

Nous nous sommes proposé de rechercher les influences exercées par la colchicine, la 6-mercaptopurine et le thalidomide sur les nucléotides libres et sur les glucides au cours de la germination des semences de *Phaseolus aureus*.

Nous décrirons dans le premier chapitre le matériel biologique et les techniques analytiques utilisées dans ce travail.

Dans le deuxième chapitre, nous étudierons les effets de ces substances sur l'aspect morphologique et sur le poids frais des germes.

Le troisième chapitre sera consacré à l'étude de la répartition et les variations des nucléotides libres chez les germes ayant subi l'influence de ces substances. Cette expérience sera menée comparativement avec celle des germes obtenus dans les conditions physiologiques.

Dans le quatrième chapitre nous déterminons les teneurs en glucides de ces germes.

Nous verrons, enfin, dans un essai d'interprétation des résultats, comment à partir des observations morphologiques des variations des nucléotides et des glucides, on peut proposer un test biochimique végétal pour étudier les effets secondaires de certains médicaments chimiques, et plus particulièrement leur éventuelle action tératogène.

RECHERCHES PERSONNELLES

Chapitre Premier.

MATÉRIEL D'ÉTUDE ET TECHNIQUES

Nous décrivons dans ce chapitre les techniques mises en œuvre au cours de nos recherches.

Matériel biologique.

Notre matériel biologique est constitué par les graines de *Phaseolus aureus* communément appelé haricot doré. *Phaseolus aureus* est une plante alimentaire appartenant à la famille des Légumineuses-papilionacées (Roxb.). Robuste, dressée, elle ne s'élève pas plus de 30 à 40 cm de haut. Les fruits sont des gousses linéaires, longues de 3,5 à 5 cm larges de 4 à 6 mm, renfermant 10 à 15 graines sub-globuleuses de 3 à 6 mm de diamètre, de couleur vert-clair. Sa culture, qui se fait dans l'Inde et dans le Sud de la Chine, est des plus faciles. Il lui faut un été chaud, humide. On l'ensemence au début de la saison des pluies. Sa végétation dure environ trois mois.

Il existe chez les graines d'une même espèce des différences de poids, de taille, de vitesse de croissance. Afin de préserver le maximum de chances d'obtenir des lots de semences homogènes destinées à notre étude, nous procédons à une sélection préalable basée sur le poids des graines. Notre choix porte sur les graines présentant à ce point de vue le caractère moyen de l'espèce selon la courbe d'allure gaussienne établie sur le même matériel par Vovan (48). Cet auteur a montré, en effet, que ce mode de sélection est efficace tout au moins au point de vue du pouvoir germinatif.

A. — *Germination.* —

Dans toute étude portant sur la croissance des tissus, il se pose pour l'expérimentateur le problème délicat du mode d'expression des résultats. En effet, parallèlement aux variations de certains constituants, la masse tissulaire varie quantitativement et qualitativement. C'est ainsi que les modifications peuvent apparaître sous un angle différent selon que l'on rapporte les résultats au poids frais, au poids sec ou à

l'individu entier. Le mode d'expression actuellement choisi par la plupart des biochimistes est celui qui se rapporte à l'acide désoxyribonucléique. Nous avons choisi pour notre part l'expression des résultats par rapport à un nombre déterminé (200) de graines sélectionnées.

Nos analyses portent donc sur des lots de 200 graines que nous faisons germer dans l'eau distillée ou dans des solutions de concentrations déterminées de colchicine, de 6-mercaptopurine ou de thalidomide. Nous adoptons ici un dispositif comportant une boîte de Pétri de 20 cm de diamètre contenant une couche de coton hydrophile de 5 mm d'épaisseur environ. La boîte Pétri est couverte d'un cristallisoir de diamètre sensiblement supérieur (Figure nº 4). Les graines sont réparties à la surface du coton imbibé d'eau distillée ou de solution contenant la substance étudiée.

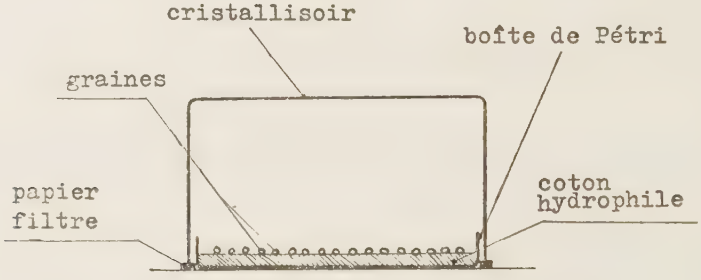


Fig. 4. — Dispositif utilisé pour la germination.

Les graines sont lavées à l'eau courante puis immergées pendant quinze minutes dans une solution à 5 g d'hypochlorite par litre et ensuite lavées abondamment à l'eau ordinaire puis à l'eau distillée. Après ce traitement elles sont étalées sur le coton hydrophile, imbibé de 100 ml de solution à étudier.

L'ensemble de ces précautions et ce dispositif permettent d'éviter d'une part le développement des moisissures pendant la germination et d'autre part l'évaporation de l'eau qui risque de fausser la concentration de la solution étudiée.

La solution de thalidomide est préparée en dissolvant la substance dans la quantité équimolaire de soude 0,1 N puis ramenée à pH = 7 à l'aide d'une solution tampon phosphate M/15. On procédera ensuite à la dilution avec de l'eau distillée.

On solubilise la 6-mercaptopurine en utilisant quelques gouttes de soude 0,1 N. Le pH de la solution mise dans le germoir ne dépasse pas 8.

Le chlorhydrate de colchicine est soluble dans l'eau.

La germination se déroule à l'obscurité (dans une étuve) à 28º-30ºC. Elle dure 72 heures. Les germes récoltés au bout de ce temps sont ensuite pesés et mis immédiatement à congeler à — 18ºC.

B. — *Traitement des germes.*

C'est à partir des germes ainsi obtenus que nous allons procéder à l'extraction des nucléotides en vue de l'étude chromatographique.

Dans certains cas, il est nécessaire d'opérer sur le matériel déshydraté (dosage des sucres libres, de l'amidon et de la cellulose). Nous avons alors recours à la préparation des poudres acétoniques.

1. *Extraction des nucléotides :* On broie les 200 germes congelés au « Turmix » en présence de 100 ml d'acide trichloracétique 0,6 N préalablement refroidi à 0°C. Après centrifugation on recueille le liquide surnageant. On traite ensuite rapidement le sédiment par 50 ml d'acide trichloracétique 0,3 N. On recueille le deuxième liquide surnageant par centrifugation. On introduit les deux liqueurs acides obtenues dans une ampoule à décantation. On procède alors à cinq lavages successifs à l'éther sulfurique froid (— 15°C) pour éliminer la majeure partie de l'acide trichloracétique. On porte la solution des nucléotides à pH = 8 par addition d'environ 3 ml d'une solution normale d'ammoniaque (l'extrait acide de couleur jaune franc passe au jaune-vert à pH = 8). On observe alors un dépôt blanchâtre qui va en augmentant au fur et à mesure qu'on concentre la solution sous pression réduite et à basse température. Après centrifugation, on sépare le liquide surnageant contenant les nucléotides et autres composés acidosolubles.

2. — *Préparation de la poudre acétonique :* On broie les germes congelés au « Turmix » en présence de 800 ml d'acétone pure refroidie à — 15°C. On recueille le résidu par filtration sur buchner. On le lave deux fois avec 100 ml d'acétone froide. On élimine les dernières traces d'acétone par aération. On obtient 7 à 8 grammes de poudre acétonique selon les qualités de germe.

C. — *Fractionnement des nucléotides.*

On réalise la séparation des nucléotides libres et autres composés acidosolubles à partir de l'extrait trichloracétique neutralisé par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions selon la méthode de Hurlbert et coll. (27). Nous utilisons les colonnes de verre de 0,8 cm de diamètre et de 18 cm de hauteur. La figure n° 5 représente schématiquement le dispositif que nous adaptons pour la séparation des nucléotides.

L'extrait neutralisé contenant les nucléotides est passé sur la résine Dowex, 1 × 8, 200-400 mailles, convertie en formiate selon la technique décrite par Grégoire et coll. (24), avec un débit de 0,6 ml/min/cm² de section de colonne. On lave ensuite avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent présente une densité optique inférieure à 0,1 à λ = 260 mμ.

On élue les nucléotides par des solutions à concentrations croissantes en acide formique et en formiate d'ammoniaque. On utilise, à cet effet, le dispositif représenté sur la figure n° 5. Le gradient d'élution est de forme convexe. A tous les stades de fractionnement, les colonnes sont maintenues à la température de + 4°C par immersion dans un bain thermostatique réfrigéré (le fluide utilisé est l'éthylène glycol dont la circulation dans le manchon *m* est assurée par la pompe du réfrigérateur de laboratoire *Rp*).

Les éluats provenant de la colonne sont évalués par leur absorption dans l'ultra-violet. Cette mesure de l'absorption est assurée par un dispositif à fonctionnement automatique UVICORD LKB 4700A (*UV* sur la fig. 5) composé d'un élément optique *o* et un élément électrique *e*. Relié directement à l'orifice d'écoulement de la colonne, cet élément

mesure et, en liaison avec un enregistrateur LKB 6520A (*E* sur la figure), enregistre en continu les variations d'absorption, révélant ainsi la présence des constituants au fur et à mesure de leur apparition. La longueur d'onde employée est de 253 mμ. La figure nº 6 montre un exemple de cet enregistrement.

Afin de nous permettre une évaluation de chaque fraction de nucléotide, nous déterminons la densité optique des éluats recueillis par fractions de 5 ml à l'aide d'un collecteur automatique fonctionnant à temps constant *F*, à la longueur d'onde de 260 mμ au spectrophotomètre manuel, cuve de quartz de 1 cm d'épaisseur. On établit les diagrammes d'élution en portant en abscisses les volumes d'éluat et en ordonnées les densités optiques.

Cette manière d'agir nous permet, d'une part, par le dispositif d'enregistrement automatique de suivre l'apparition des fractions et d'agir sur l'évolution du gradient afin de perdre le minimum de temps, et d'autre part, par la mesure manuelle à $\lambda = 260$ mμ, de faire une étude quantitative.

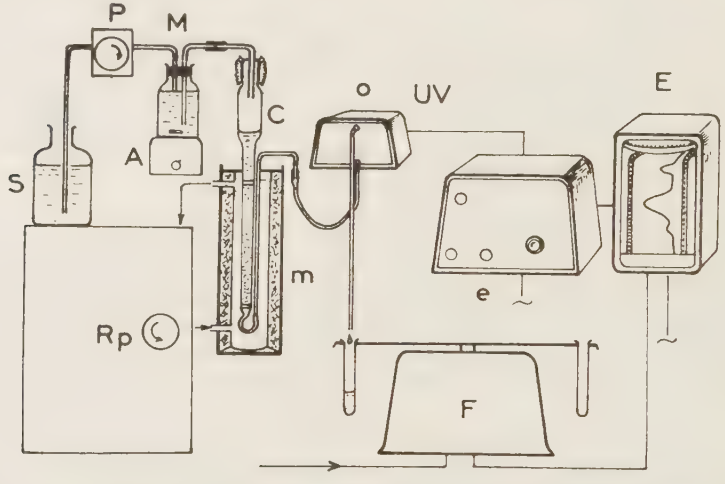


Figure 5. — Dispositif utilisé pour la chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions avec enregistrement automatique de l'absorption UV des éluats.

Rp : Réfrigérateur de laboratoire avec pompe incorporée
S : Fiole contenant le solvant concentré
P : micropompe
M : flacon mélangeur de 250 ml, initialement rempli d'eau distillée. L'éluant provenant de S est intimement mélangé à l'eau distillée grâce à un agitateur magnétique A
C : Colonne de résine plongée dans un manchon m. Dans ce manchon circule un fluide thermostaté grâce à la pompe incorporée du réfrigérateur.
UV : Elément Uvicord, indicateur d'absorption ultra-violette composé d'un élément optique o et d'un élément électrique e.
E : Enregistreur à courant continu relié à l'indicateur d'absorption. Enregistreur à cadre mobile indique automatiquement les changements de fraction par un changement de couleur du tracé d'enregistrement.
F : collecteur de fractions automatique fonctionnant à temps constant.

On évalue avec une très bonne approximation la quantité de chaque nucléotide individualisé sur le chromatogramme, en faisant intervenir le volume total de chaque fraction ainsi que le coefficient d'extinction moléculaire à $\lambda = 260$ mμ propre à chaque nucléotide. Ces coefficients déterminés en milieu acide sont les suivants : (Pabst Circular OR - 10).

— dérivés de l'adénosine..... $14{,}4.10^3$
— dérivés de la guanosine ..... $11{,}8.10^3$
— dérivés de l'uridine ..... $9{,}9.10^3$
— dérivés de la cytidine ..... $6{,}3.10^3$

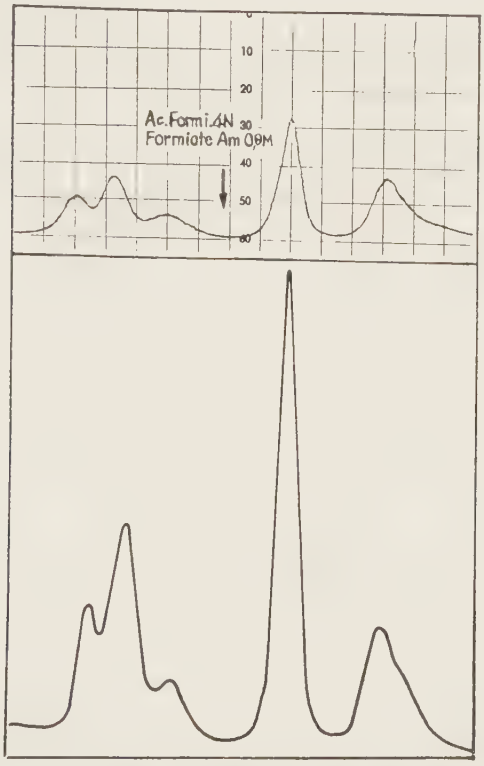


Figure 6. — Exemple de courbe d'enregistrement automatique des éluats provenant de la chromatographie sur colonne (en haut) et de diagramme établi à la suite de la mesure manuelle de ces mêmes éluats, au spectrophotomètre à $\lambda = 260$ mμ *(en bas).*

Exemple : calcul de la teneur en ATP

Considérons un pic correspondant à l'ATP ayant une densité optique à son point culminant égale à 3,00 et qui s'étend sur 130 ml. On l'assimile à un triangle de base B = 130 et de hauteur DO = 3. En adoptant le coefficient d'extinction moléculaire des dérivés de l'adénosine, nous aurons :

$$\mu \text{ mol. d'ATP} = \frac{3 \times 130}{14{,}4 \times 2} = 13{,}7$$

Vovan (48) a montré avec des preuves expérimentales à l'appui, qu'on peut considérer ce mode de calcul comme valable car il permet d'évaluer les teneurs en nucléotides avec une erreur de ± 8 p. 100.

La chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions permet de séparer, à partir d'un extrait total plusieurs fractions dont certains sont hétérogènes.

D. — *Concentration et purification des nucléotides.*

1) *Par adsorption sur charbon actif :* Les fractions correspondant à un même pic sont concentrées et purifiées par adsorption quantitative sur charbon actif et élution par l'éthanol aqueux ammoniacal.

On met le charbon « Activit 50XL » purifié dans une colonne de 1 cm de diamètre intérieur. La solution de nucléotides filtre lentement à travers le charbon. Après lavage de la colonne, par écoulement continu, à l'eau distillée jusqu'à ce que l'eau de lavage soit neutre, on élue les nucléotides à l'aide de quelques ml d'une solution d'alcool à 50 p. 100 contenant pour 100 ml, soit, 0,1 ml d'ammoniaque concentrée pour les nucléotides labiles, soit 0,5 ml d'ammoniaque concentrée pour les autres nucléotides.

L'éluat contenant les nucléotides est concentré sous dessiccateur sur du chlorure de calcium et de l'anhydride phosphorique.

Cette opération se déroule en chambre froide (6°C).

2) *Par chromatographie préparative sur papier:* La solution des nucléotides concentrée à petit volume est déposée selon une bande étroite à la partie supérieure d'une feuille de papier Whatman 3MM. Le chromatogramme est développé avec le solvant n° 1 (voir plus loin). Chaque zone absorbant dans la lumière ultraviolette et révélée sous lampe UV (CAMAG) ($\lambda = 257$ mμ) est découpée et éluée à l'eau.

E. — *Identification des nucléotides.*

L'identification des nucléotides repose sur un ensemble de données qualitatives et quantitatives. Ce sont :

— l'ordre d'apparition des nucléotides lors de la chromatographie initiale;
— la nature de leur spectre d'absorption dans l'ultraviolet déterminé à différents pH (1, 7, 13);
— le comportement des nucléotides à la chromatographie sur papier et sur couche mince par comparaison avec des nucléotides de référence (Pabst);
— l'analyse chimique.

1) *Spectrophotométrie dans l'ultraviolet.* — On utilise les cuves de quartz d'un cm d'épaisseur. Les spectres d'absorption sont déterminés sur des quantités de nucléotides inférieures ou égales à 0,1 μmole/ml, dans les limites de longueurs d'onde comprises entre 220 mμ et 320 mμ. Les spectres d'absorption dans l'ultraviolet des substances étudiées sont comparés avec les spectres caractéristiques et classiquement connus de chaque catégorie de nucléotides.

2) *Chromatographie sur papier.* — On dépose sur la même feuille de papier Whatman n° 1 ou Whatman n° 3MM, la solution à étudier (contenant environ 0,1 μmole de nucléotide) et la même quantité de nucléotide de référence. Après une durée de migration de 18 à 48 heures selon le cas, on compare leur Rf; l'emplacement des nucléotides sur

les chromatogrammes est déterminé grâce à une lampe UV (CAMAG) (longueur d'onde = 257 mμ).

3) *Chromatographie sur couche mince.* — L'acide cytidylique (CMP) et le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) sont difficiles à séparer au cours de la chromatographie sur colonne de résine et même par chromatographie sur papier. En règle générale, on procède à une seconde chromatographie sur colonne, en utilisant un gradient beaucoup plus lent en acide formique.

Les très petites quantités (environ 40 μg) que nous avons réussi à récupérer lors de la séparation sur colonne ne nous permettent pas de procéder à cette opération. Aussi faisons-nous appel à la technique moderne de chromatographie sur couche mince.

A cet effet, nous utilisons la cellulose avec plâtre MN 300G étalée en couche de 0,25 mm sur des plaques de verre de 10 × 20 cm. En utilisant le solvant n° 3 (voir ci-après) et au bout de 90 minutes de migration, ces deux substances sont parfaitement individualisées, ainsi que montre un exemple représenté sur la figure n° 7. En plus de cet avantage, cette technique a le mérite d'être rapide. Néanmoins, elle ne permet pas, comme c'est le cas de la chromatographie sur papier, de récupérer le nucléotide pour des fins analytiques puisque les quantités de substances déposées sont très faibles (5 μg).

Solvants utilisés pour la chromatographie :

Solvant n° 1 : Ethanol 95° — acétate d'ammonium M, pH = 7,5 (7,5 : 3 v/v)

Solvant n° 2 : Acide isobutyrique - ammonique conc. - eau (66 : 1 : 33 v/v)

Solvant n° 3 : n-Butanol - acétone - acide acétique - ammoniaque à 5 p. 100 - eau (3,5 : 2,5 : 1,5 : 1,5 : 1)

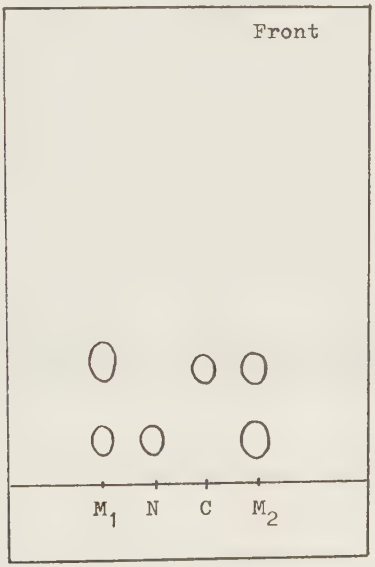


Figure 7. — Chromatographie sur couche mince des nucléotides. C = CMP; N = NAD; M = mélange des deux

Les oses migrant sur les chromatogrammes sont mis en évidence à l'aide des réactifs au phtalate d'aniline (37), au nitrate d'argent en milieu alcalin, au naphtorésorcinol (46).

4) *Analyse chimique.* — Le *phosphore* est dosé par la méthode de Briggs (6). Cette méthode est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique par l'hydroquinone. Le phosphore total est dosé après minéralisation de la substance par l'acide sulfurique concentré en présence de quelques gouttes de perhydrol.

Le *ribose* des nucléotides est dosé par la méthode colorimétrique de Mejbaum (31). Le ribose chauffé en présence d'orcine chlorhydrique et de perchlorure de fer donne une coloration verte dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de ribose mise en œuvre.

L'identification du *nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)* et du *nicotinamide adénine dinucléotide phosphate* repose sur leur comportement chromatographique sur colonne, sur leur spectre d'absorption dans l'ultraviolet avant et après action du cyanure de potassium. En effet, en présence de cyanure et à pH = 11, on observe l'apparition d'un second maximum à 327 mμ. Enfin, la chromatographie sur papier en présence des substances témoins confirme ces données.

F. — *Analyse des glucides.*

Pour la détermination de la teneur en matières amylacées et cellulosiques des germes de *Phaseolus aureus* nous avons utilisé la technique mise au point par Dumazert et coll. (14). On solubilise l'amidon contenu dans le matériel végétal (sous forme de poudre acétonique) par un traitement de ce dernier dans l'alcool sulfurique. On extrait ensuite l'amidon soluble par l'eau bouillante. Après hydrolyse acide de l'amidon isolé, on dose le glucose formé par la méthode de Gabriel Bertrand. Le résidu abandonné après extraction de l'amidon est traité successivement par une solution normale d'acide chlorhydrique, par une solution normale de soude puis par une solution à 5 p. 100 d'hypochlorite de sodium. La fraction insoluble dans ces divers solvants est lavée à l'eau distillée, séchée et pesée : cette fraction représente la matière cellulosique.

Les *sucres réducteurs libres* sont extraits par l'alcool à 80°. On évapore la solution alcoolique sous pression réduite. On reprend le sirop par un volume déterminé d'eau distillée. Après défécation cadmique (12) de la solution aqueuse, on dose les sucres réducteurs par la méthode de Hagedorn et Jensen (25).

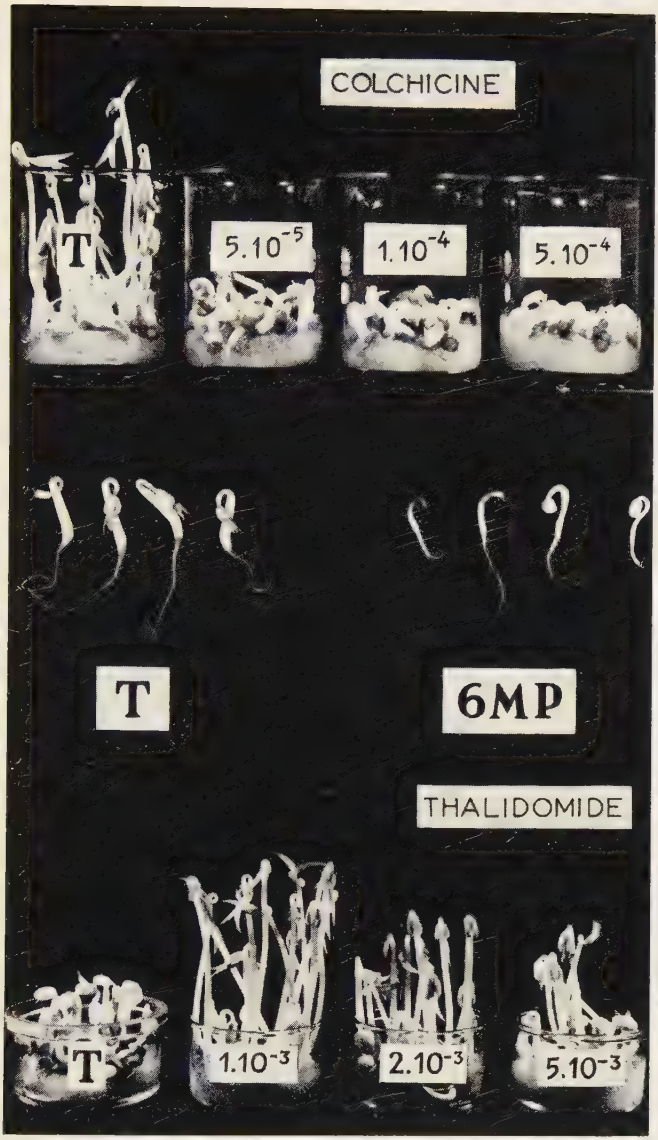


Figure 8. — Photographies des germes obtenus à partir des semences de Phaseolus aureus mises à germer en présence de colchicine, de 6-mercaptopurine (6MP) et de thalidomide.

Colchicine : germes de 96 heures
6MP et thalidomide : germes de 72 heures
Température : 28°C, à l'obscurité.

Chapitre II

ACTION DE LA COCHICINE, DE LA 6-MERCAPTOPURINE ET DU THALIDOMIDE SUR L'ASPECT MORPHOLOGIQUE DES GERMES DE Phaseolus aureus

La teneur en nucléotides libres des germes de *Phaseolus aureus* atteint le maximum après 48 heures de germination (48). Nous avons essayé au cours d'une expérience d'orientation de faire germer les semences pendant 24 h., 48 h., et 72 h. en présence des substances antimitotiques. Nous nous sommes aperçu que la durée de 48 heures est insuffisante car à ce stade, nous n'avons observé macroscopiquement aucune différence sensible entre les germes traités et les germes témoins. Par contre, les effets se manifestent d'une manière évidente chez les germes de 72 heures. Nous avons alors adopté ce temps de germination pour notre étude.

Deux essais ont été menés. Dans un premier temps, nous avons tenté de déterminer la concentration optimum qui déclanche l'activité maximum des substances testées sur la germination. A cet effet, après une série d'essais d'orientation, nous avons utilisé les concentrations suivantes pour les trois composés :

Colchicine : 5.10^{-5}, 1.10^{-4} et 5.10^{-4}
6-mercaptopurine : 1.10^{-4}, 1.10^{-3} et 5.10^{-3}
Thalidomide : 1.10^{-5}, 5.10^{-4}, 1.10^{-3}, 2.10^{-3} et 5.10^{-3}

(le thalidomide a été testé à plusieurs concentrations car c'est le seul des trois composés à exercer une action stimulante sur la germination comme nous le verrons plus loin).

Une fois la que concentration optimum est déterminée, nous faisons germer des lots de 200 graines sélectionnées.
Les concentrations adoptées sont les suivantes :

Colchicine : 10^{-4}
6-mercaptopurine : 10^{-3}
Thalidomide : 10^{-3}

Les germes récoltés serviront de matériel biologique pour l'analyse des glucides et celle des nucléotides libres. Les lots de semences germées dans de l'eau distillée constitueront des témoins.

Résultats.

Sur la figure nº 8, nous reproduisons les photographies représentant les germes obtenus dans les conditions décrites ci-dessus.

Notons tout d'abord la très grande différence de morphologie des germes poussés dans divers milieux par rapport aux témoins.

Si la colchicine exerce une action inhibitrice très nette sur la croissance (hauteur des hypocotyles), le thalidomide possède par contre une action stimulatrice, tandis que la 6-mercaptopurine n'a pratiquement pas d'action.

On remarque que les hypocotyles des germes poussées sur colchicine ont un calibre nettement supérieur à celui des témoins, ce qui leur donne un aspect « nain ». Le thalidomide n'affecte pas cet aspect alors que la 6-mercaptopurine rend les germes plus frêles.

En ce qui concerne les radicules, la figure nº 9 montre que celles-ci sont diminuées parallèlement aux hypocotyles chez les germes récoltés sur milieu contenant de la colchicine, tandis qu'elles ne présentent pas de variations sensibles par rapport aux témoins, chez les germes poussés dans les deux autres milieux.

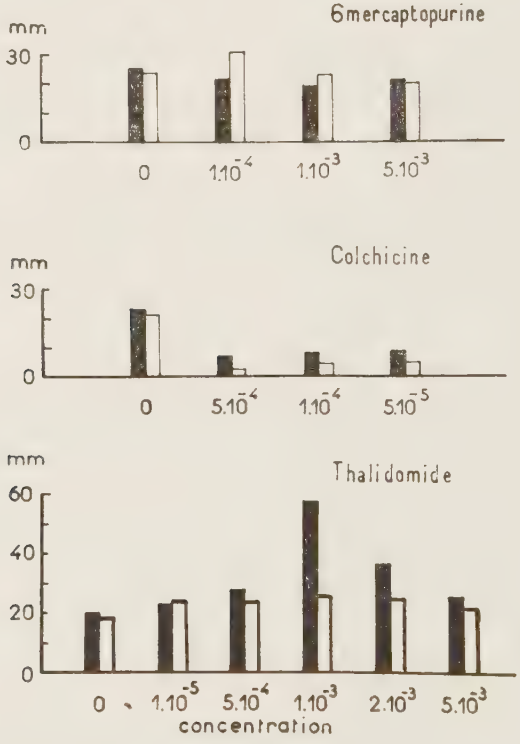


Figure 9. — Représentation schématique des longueurs des hypocotyles et des radicules des germes.

En noir : hypocotyles
En blanc : radicules

— INFLUENCE EXERCÉE SUR LE POIDS DES GERMES.

Les poids des germes des différents lots sont récapitulés dans le tableau II.

Tableau II. — Poids de 200 germes (hypocotyle + radicule + cotylédons) de 72 h., poussés sur colchicine, 6-mercaptopurine et thalidomide.

Substance	*Poids des semences (g)*	*Poids des germes (g)*	*Variations p. 100 par rapport aux témoins*
Témoins	8,5	60	—
Colchicine ($c = 10^{-4}$)	8,3	51	— 15
6-mercapto-purine ($c = 10^{-3}$)	8,6	45	— 25
Thalidomide ($c = 10^{-3}$)	8,4	82	+ 35

Si nous considérons le poids frais auquel les germes sont parvenus au bout de 72 heures de germination, nous remarquerons que le poids le plus élevé est atteint, avec 82 g pour 200 germes, par le traitement avec le thalidomide. La différence du poids frais des germes traités par la colchicine (— 15 p. 100) avec celui des germes témoins n'est pas aussi importante que ne laissait prévoir la diminution de la taille. Par contre, le petit calibre observé chez les germes obtenus sur milieu contenant de la 6-mercaptopurine est suivi d'une importante diminution de leur poids. (— 25 p. 100 par rapport aux témoins).

Chapitre III

INFLUENCES EXERCÉES PAR LA COLCHICINE, LA 6-MERCAPTOPURINE ET LE THALIDOMIDE SUR LES NUCLÉOTIDES LIBRES DES GERMES DE *PHASEOLUS AUREUS*

I. — Sur la teneur en Nucléotides Totaux.

D'après les proportions respectives de chaque nucléotide des germes de *Phaseolus aureus*, nous adaptons, comme l'a préconisé Vovan (48), pour le calcul des nucléotides totaux un coefficient moléculaire moyen de 12,5 (à $\lambda = 260$ mμ) en milieu acide.

La teneur en nucléotides totaux des extraits de germes a été estimés en fonction de la différence entre la densité optique de l'extrait à $\lambda = 260$ mμ et celle du filtrat et des eaux de lavage de la colonne de Dowex.

Nous consignons dans le tableau III les quantités de nucléotides totaux chez les germes récoltés à partir de divers milieux après 72 heures de germination, dans les conditions déjà précisées.

Tableau III. — Teneurs en nucléotides totaux des germes de 72 h. de Phaseolus aureus. Etude de l'influence de diverses substances.

Substance	*Nombre d'unités spectrophotométriques à* $\lambda = 260$ *mμ* (*)			*Nucléotides totaux (μmol. pour 200 germes)*
	Extrait acide	*Filtrat + eau de lavage*	*Différence*	
Témoins	923	255	668	53,5
Colchicine	736	316	420	33,6
6MP	597	207	390	31,2
Thalidomide	930	236	700	56,0

(*) *Le nombre d'unités spectrophotométriques a été défini comme le produit de la densité optique de l'extrait (trajet optique = 1 cm) par son volume en ml.*

L'examen du tableau III montre que la teneur en nucléotides totaux est fortement diminuée chez les germes récoltés sur milieux contenant de la colchicine (— 37 p. 100 par rapport aux témoins) et

de la 6-mercaptopurine (— 41,5 o. 100). Cette teneur est la plus forte chez les germes ayant subi l'influence du thalidomide.

II. — Sur la Repartition des Nucléotides.

Nous avons utilisé une méthode de fractionnement rapide afin d'éviter, le plus possible, l'altération de la structure native des nucléotides. C'est la technique décrite par Mandel (29) et applicable à l'analyse de petites quantités de nucléotides, que nous avons légèrement modifiée.

Les fractionnements sont effectués sur des petites colonnes de Dowex 1 × 8 (formiate). On utilise un gradient d'élution assez élevé.

Pour chaque catégorie de germes, deux ou trois essais ont été conduits. Nous avons obtenu dans l'ensemble des résultats parfaitement reproductibles. Nous nous contenterons de présenter, à titre d'exemple, une chromatographie typique de chaque lot de germes (Figures nº 10, 11, 12 et 13). Les diagrammes d'élution représentés sur ces figures sont obtenus en portant en ordonnées l'absorption à $\lambda = 260$ mμ des éluats recueillis par fractions de 5 ml et en abscisses les volumes d'éluat. Nous indiquons dans la légende des figures, les concentrations en acide formique et en formiate d'ammonium utilisées pour l'élution.

L'examen de ces diagrammes montre que la chromatographie sur échangeur d'anions permet de séparer neuf fractions principales désignées par les lettres de A à J. Ces fractions sont naturellement hétérogènes. L'analyse a permis de reconnaitre, comme nous le verrons plus loin, le principal constituant de chaque fraction (abréviation notée en tête de chaque pic).

Deux fractions désignées par les lettres Y et X sont rétrouvées respectivement sur les diagrammes relatifs aux germes ayant subi l'influence de la 6-mercaptopurine et du thalidomide.

Toutes les fractions ont été concentrées par adsorption sur charbon « activit ». Certaines d'entre elles ont été purifiées par chromatographie préparative sur papier.

Notre étude se divise en trois parties : dans un premier temps nous procédons à une identification des nucléotides séparés; — nous étudierons ensuite plus particulièrement les fractions Y et X dont l'apparition dans les diagrammes « 6-mercaptopurine » et « thalidomide » présentent un intérêt certain; — enfin nous essaierons de récapituler quantitativement les résultats.

A. — *Identification des fractions.*

Toutes les fractions isolées lors des chromatographies sur colonne subissent le même traitement en vue de leur identification. De plus les fractions portant les mêmes lettres sont identiques à quelques nuances près. Pour la commodité de l'exposé, nous ne décrirons en détails à titre d'exemple que l'étude des fractions provenant des germes récoltés à partir du milieu contenant de la 6-mercaptopurine. Chemin faisant, nou signalerons les particularités éventuelles de chaque lot.

Fraction A.

Par chromatographie sur papier Whatman 3MM, solvant nº 2, après une migration de 17 heures, la révélation par la lumière ultraviolette montre une tache migrant comme un témoin NAD (Pabst).

Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet est caractéristique des nicotinamides adénine-dinucléotides. Par action du cyanure de potassium à pH = 11 on voit apparaître un maximum d'absorption à $\lambda = 327$ mμ.

En outre, chez les germes témoins et les germes « thalidomide », la chromatographie sur couche mince a permis d'identifier une petite quantité de CMP.

La fraction A est donc constituée par le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) chez tous les germes et par une petite quantité de cytidine monophosphate (CMP) chez les germes témoins et ceux récoltés à partir du milieu contenant du thalidomide.

Fraction B.

La fraction B se comporte comme une substance pure lors de la chromatographie sur colonne. La chromatographie sur papier, solvant n° 1, ne révèle qu'une tache migrant comme un échantillon d'AMP pur. Le spectre d'absorption de la tache découpée et éluée, en milieu acide et en milieu alcalin est caractéristique des dérivés adényliques.

Fraction C.

L'analyse de la fraction C n'a pu être effectuée que sur les germes « témoins », « colchicine » et « 6-mercaptopurine ».

Par chromatographie sur papier Whatman 3MM, solvant n° 2, durée de migration 17 heures, on note la présence de deux taches 1 et 2.

La tache 1 migre comme un échantillon de NADP pur. Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet est caractéristique des nicotinamides adénine-dinucléotides (maximum d'absorption à $\lambda = 257$ mμ en milieu acide). Par action du cyanure de potassium à pH = 11, on voit apparaître un maximum d'absorption à 327 mμ.

La tache 2 migre à 27,2 cm de la ligne départ au bout de 17 heures. Elle présente un spectre d'absorption qui va en décroissant des petites longueurs d'onde aux grandes longueurs d'onde, qu'elle soit en milieu acide ou en milieu alcalin. La faible quantité de substance disponible ne nous a pas permis d'effectuer d'autres analyses.

En bref, la fraction C est constituée essentiellement par le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP).

Fraction D.

La fraction D est très hétérogène. En effet, la chromatographie sur papier Whatman 3MM, solvant n° 1, développement 17 heures, permet de séparer trois substances.

LÉGENDE COMMUNE AUX FIGURES 10, 11, 12 ET 13.

Chromatographie d'extraits de germes de Phaseolus aureus sur échangeur d'anions Dowex 1 × 8, 200-400 *mailles (formiate), colonne de* 0,8 *cm de diamètre intérieur, hauteur de résine :* 18 *cm.*

Le ballon mélangeur de 250 *ml de capacité, initialement rempli d'eau est alimenté successivement par les solutions suivantes :*

en a : acide formique 0,1 *N*
en b : acide formique 4 *N*
en c : acide formique 4 *N, formiate d'ammonium* 0,2 *M*
en d : acide formique 4 *N, formiate d'ammonium* 0,8 *M*

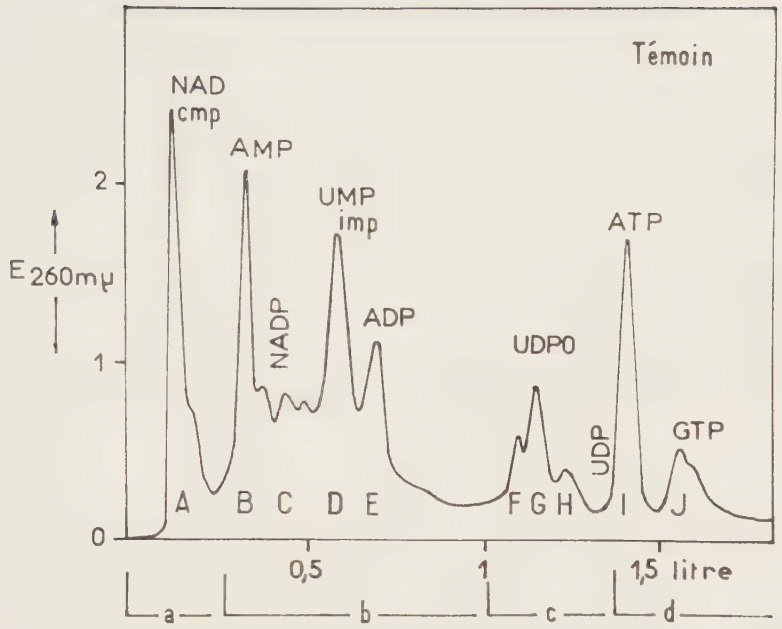


Figure 10. — *Nucléotides des germes témoins*

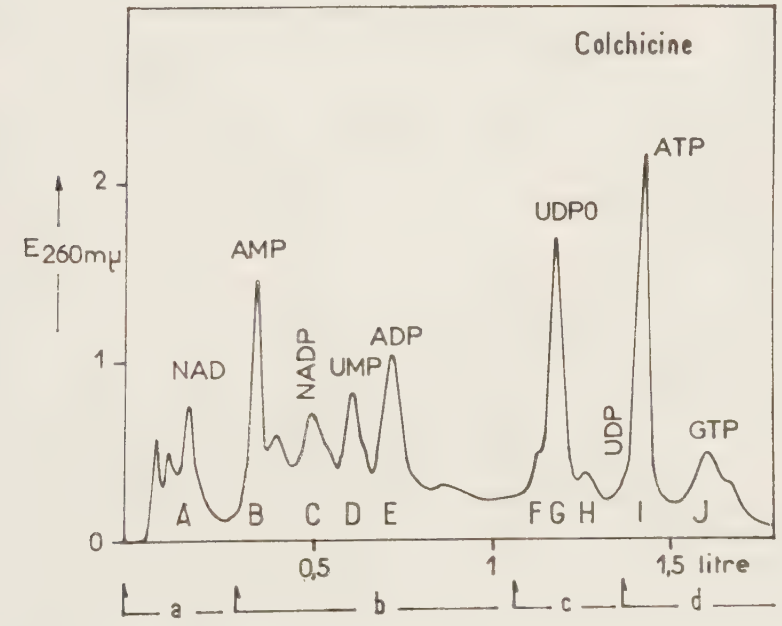


Figure 11. — *Nucléotides des germes récoltés sur milieu contenant de la colchicine à la concentration de* 10^{-4}.

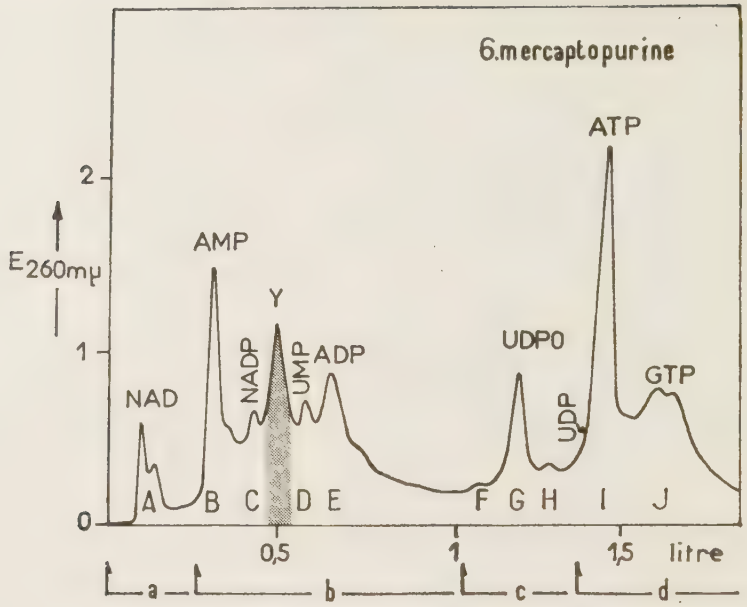


Figure 12. — *Nucléotides des germes récoltés sur milieu contenant de la 6-mercaptopurine à la concentration de* 10^{-3}.

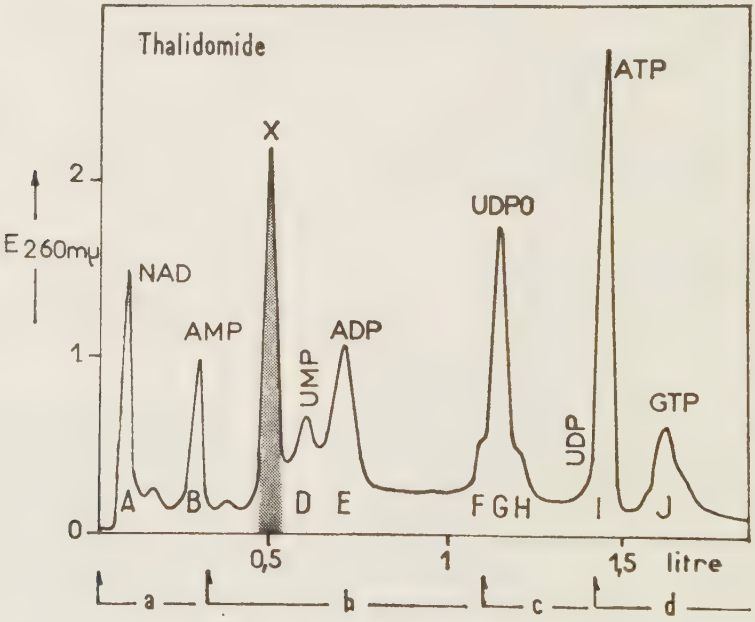


Figure 13. — *Nucléotides des germes récoltés sur milieu contenant du thalidomide à la concentration de* 10^{-3}.

La première substance a été identifiée à l'uridine monophosphate (UMP) par son comportement à la chromatographie sur colonne, par sa migration identique à un échantillon d'UMP pur à la chromatographie sur papier, solvant n° 1. Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet possède un maximum à $\lambda = 261$ mμ en milieu acide et à $\lambda = 260$ mμ en milieu alcalin. Ce spectre est caractéristique des dérivés uridyliques. En outre, les dosages chimiques donnent 0,95 atome de phosphore par molécule de nucléoside et 0,88 molécule de ribose par molécule de nucléoside.

Les deux autres substances existent en très faible quantité. L'une d'elles pourrait être identifiée à l'inosine monophosphate (IMP) par son comportement chromatographique et par son spectre d'absorption dans l'ultraviolet. La troisième substance est fluorescente à $\lambda = 350$ mμ.

La fraction D renferme donc essentiellement l'uridine monophosphate (UMP) et une très faible quantité d'inosine monophosphate (IMP).

Fraction E.

Notons que quelques tubes collectés sur le versant droit du pic présentent une coloration jaune et fluorescente. Cela correspond vraisemblablement au flavine-adénine dinucléotide (FAD).

Après chromatographie sur papier Whatman n° 3MM, solvant n° 2, développement 17 heures, on a séparé trois taches. L'une d'elles est fortement fluorescente. Il s'agit probablement du FAD.

Une tache migre comme un échantillon d'adénosine diphosphate (ADP) pur. Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet en milieu acide et en milieu alcalin est caractéristique des dérivés adényliques. Les teneurs en phosphore et en ribose pour une molécule de nicléoside sont respectivement de 2,08 atomes et de 0,90 molécule.

Il s'agit bien de l'adénosine diphosphate (ADP).

La dernière tache, en très faible quantité d'ailleurs, a son spectre d'absorption UV ayant un maximum à 260 mμ en milieu acide. Étant donné la quantité de substance disponible, il ne nous a pas été possible de procéder à d'autres analyses.

En bref, la fraction E est constituée essentiellement de l'ADP et probablement du FAD.

Fraction F.

La fraction F qui émerge de la colonne juste avant la fraction G des uridines diphosphates-oses n'a pu être analysée correctement, étant donné sa faible quantité. Néanmoins, sa place sur le chromatogramme, son spectre d'absorption dans l'ultraviolet caractéristique des dérivés uridyliques laissent penser qu'il s'agit vraisemblablement de l'uridine diphosphate-N-acétyl-osamine (48).

Fraction G.

La fraction G renferme trois substances. Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet est caractéristique des dérivés de l'uridine.

Son hydrolyse par l'acide chlorhydrique 0,02 N en tube scellé pendant 15 minutes, libère des substances réductrices. La chromatographie sur papier des oses libérés par hydrolyse, effectuée dans le solvant acétate d'éthyle-pyridine- eau (2 : 1 : 2 v/v), montre après

révélation par le nitrate d'argent et par le réactif au phtalate d'aniline, la présence de glucose, de galactose et des traces d'arabinose. Parmi les oses identifiés, le glucose prédomine très nettement.

Les trois nucléotides présents dans cette fraction sont des nucléotides conjugués : uridine diphosphate-glucose (UDPG), uridine-diphosphate-galactose (UDPGal) et uridine-diphosphate-arabinose (UDPArb). Ces nucléotides jouent un rôle très important dans les réactions de transglycosylation chez les plantes (Leloir et coll. (cf. 48) et dans la biosynthèse des polysaccharides (Feingold, cf. 48).

Fraction H.

Nous n'avons pas pu analyser cette fraction à cause de sa faible présence.

Fraction I.

Cette fraction est très hétérogène. Par chromatographie sur papier Wharman 3MM, solvant n° 2, développement 19 heures, on obtient cinq taches réparties selon le schéma de la figure n° 14.

En centimètres parcourus, les migrations ont été les suivantes :

Tache 1 : 8
Tache 2 : 14
Tache 3 : 18,5
Tache 4 : 24,2
Tache 5 : 30,5

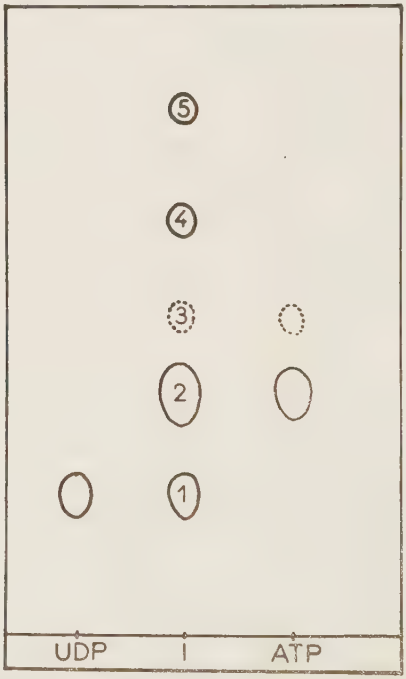


Figure 14. — Séparation des constituants de la fraction I par chromatographie sur papier ; solvant n° 2. Révélation à l'aide d'une lampe UV (CAMAG-Paris-Labo).

Notons que les taches 1,2 et 3 ont été retrouvées dans toutes les chromatographies tandis que les taches 4 et 5 ne sont pas constantes.

La tache 1 migre dans ce solvant comme un échantillon témoin d'uridine diphosphate (UDP). Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet en milieu acide et en milieu alcalin est caractéristique des dérivés uridyliques.

La tache 2 migre comme un échantillon témoin d'adénosine triphosphate (ATP). Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet est caractéristique des dérivés adényliques. Les résultats de l'analyse chimique sont rapportés dans le tableau IV. Tous ces résultats indiquent que ce constituant est bien l'adénosine triphosphate (ATP).

La tache 4 n'a été retrouvée que chez les germes récoltés à partir des milieux contenant de la 6-mercaptopurine. Son spectre d'absorption dans l'ultraviolet présente en milieu acide un maximum à $\lambda = 273$ mμ et en milieu alcalin un maximum à $\lambda = 268{,}5$ mμ. L'analyse chimique donne des résultats consignés dans le tableau IV.

La tache 5 n'a été retrouvée que chez les germes « 6MP » comme la tache 4. Son spectre d'absorption dans l'ultra-violet est caractéristique des dérivés cytidyliques. Les résulats de l'analyse chimique se trouvent dans le tableau IV.

Compte tenu de ces résultats, on peut conclure que la fraction I est constituée principalement par l'ATP et par l'UDP. Dans certains cas, on retrouve une petite quantité de CTP.

Signalons enfin que la tache 3, qui correspond à l'ADP, représente vraisemblablement un produit de dégradation de l'ATP.

Tableau IV. — Analyse chimique de la fraction I. Les constituants de la fraction ont été séparés par chromatographie sur papier.

Constituant	*Phosphore (at./mol. de nucl.)*	*Ribose (mol./mol. de nucl.)*
2 (ATP)	3,07	1,07
4 (?)	0,37	0,61
5 (CTP)	3,20	0,99

Fraction J.

Cette fraction se comporte à la chromatographie sur papier, solvant n° 2, développement 20 heures comme une substance homogène. Cependant son spectre d'absorption dans l'ultraviolet en milieu acide et en milieu alcalin, bien que caractéristique des dérivés guanyliques, ne montre pas sa parfaite pureté. L'analyse chimique donne :

phosphore : 3,1 at/mol. de nucléoside
ribose : 0,96 mol./mol. de nucléoside.

Il est probable que cette fraction soit constituée principalement de guanosine triphosphate (GTP) et des traces d'uridine triphosphate (UTP).

B. — *Étude des fractions Y et X.*

1/ *Fraction Y :* La fraction Y apparait lors de la chromatographie des extraits de germes ayant subi l'influence de la 6-mercaptopurine. Elle émerge de la colonne après le NADP. Après purification et concentration sur charbon, nous avons procédé à la chromatographie sur papier, dans les conditions suivantes :

Papier Whatman 3MM
Solvants : N° 1 et n° 2
Développement : 17 heures.

Les chromatogrammes obtenus dans ces conditions sont schématiquement représentés sur la figure n° 15. Dans le solvant n° 1, la fraction Y se sépare en trois constituants (taches 6, 7 et 8), tandis qu'avec le solvant n° 2, une tache supplémentaire est apparue.

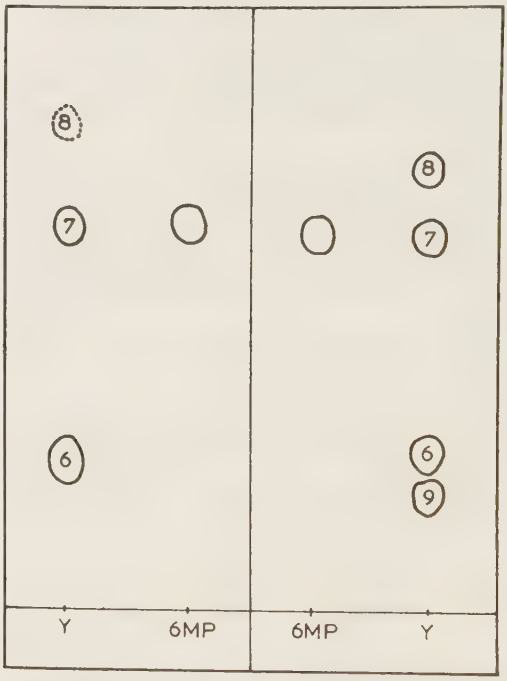


Figure 15. — Séparation des constituants de la fraction Y par chromatographie sur papier Whatman n° 1.

A gauche : solvant n° 1 ; à droite : solvant n° 2. Révélation à la lumière ultraviolette.

La tache 6 présente un spectre d'absorption dans l'ultraviolet ayant un maximum d'absorption en milieu acide à $\lambda = 280$ mμ. L'analyse chimique donne 0,94 atome de phosphore par molécule de substance. Il s'agit probablement du cytidine monophosphate (CMP); nos analyses ne sont pas assez poussées pour pouvoir l'affirmer.

Le constituant 7 migre dans les solvants comme un échantillon de 6-mercaptopurine pure (Merck). Il présente comme son témoin une fluorescence jaune à $\lambda = 350$ mμ. Cependant, son spectre d'absorp-

tion en milieu acide (maximum à $\lambda = 275$ mμ) et en milieu alcalin (spectre décroissant) n'est pas identique à celui que nous avons déterminé à partir de la 6-mercaptopurine pure (voir page 28). Il ne renferme ni phosphore, ni ribose. Dans l'état actuel de nos connaissances, nous pensons qu'il pourrait s'agir d'un métabolite très proche de la 6-mercaptopurine.

La tache 8 présente une fluorescence bleue à la lumière de Wood.

En conclusion, la fraction Y qui ne se trouve que dans le chromatogramme relatif aux germes récoltés sur milieu contenant de la 6-mercaptopurine renferme, à côté d'une faible quantité de CMP, un ou des métabolites de la substance étudiée.

2/ *Fraction X :* La fraction X occupe une place analogue à celle de la fraction Y sur le diagramme d'élution relatif aux germes ayant subi l'influence du thalidomide. Elle est importante puisqu'elle représente environ 13 p. 100 des nucléotides totaux. Son spectre d'absorption global présente un maximum en milieu acide à $\lambda = 275$ mμ.

Par chromatographie sur papier Whatman n° 1, solvant n° 1, développement 20 heures, on a séparé 4 constituants (taches 10, 11, 12 et 13 de la figure n° 16).

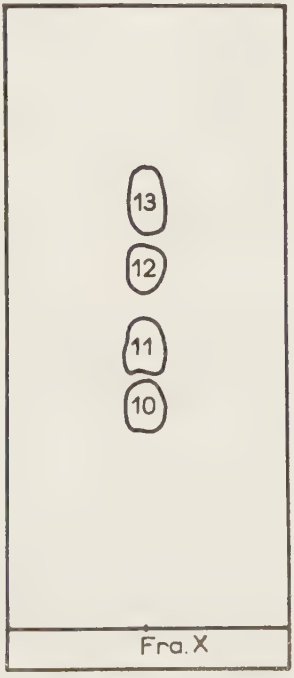


Figure 16. — *Séparation de la fraction X par chromatographie sur papier Whatman n°* 1.

Les constituants 10 et 11 présentent un spectre d'absorption dans l'ultra-violet en milieu acide et en milieu alcalin identique à celui du thalidomide pur (figure n° 17). Ils ne renferment ni phosphore, ni ribose. Nous avions tout d'abord pensé qu'il s'agissait du thalidomide lui-même.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cherché quel est le comportement du thalidomide vis-à-vis de la chromatographie sur résine échangeuse d'anions Dowex 1 × 8.

Nous avons chargé sur une colonne identique à celles utilisées pour la séparation des nucléotides des germes, un mélange contenant 2,5 micromoles de chacun de ces composés : AMP, ADP et thalidomide. Nous avons élué les substances avec une solution d'acide formique 4N,

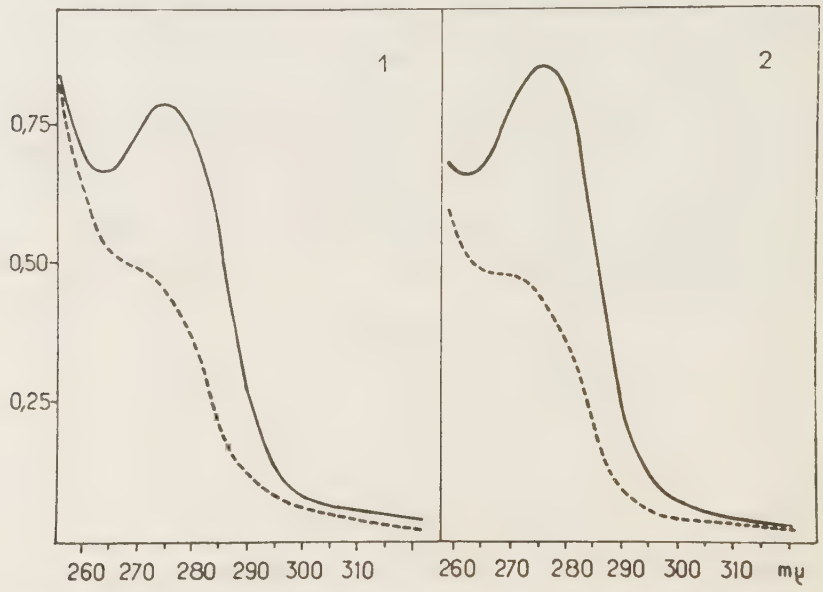


Figure 17. — *Spectres d'absorption dans l'ultraviolet du thalidomide* (1) *et des constituants* 10 *et* 11 *de la fraction X* (2).

———————— : milieu HCl 0,1 N
— — — — — — — : milieu NaOH 0,1 N

le ballon mélangeur ayant une capacité de 250 ml. Le diagramme d'élution obtenu est représenté sur la figure nº 18.

Les quantités de nucléotides et de thalidomide récupérées, calculées selon le processus décrit dans le chapitre premier, sont consignées dans le tableau V. On constate une récupération quasi-totale des nucléotides tandis que 50 p. 100 environ de thalidomide seulement ont été retenus par la résine.

On remarque que le thalidomide émerge de la colonne au même endroit que la fraction Y.

Pour toutes ces raisons, il n'est pas hasardeux de penser que les substances 10 et 11, principaux constituants de la fraction Y, pourraient être le thalidomide lui-même en molécule intacte et l'un de ses métabolites (nous savons qu'il en existe neuf (2). Il nous faudrait, pour confirmer cette hypothèse, opérer sur une quantité beaucoup plus grande (de l'ordre de deux à trois kilogrammes) de germes.

Des taches 12 et 13, nous n'avons pu déterminer que les spectres d'absorption qui ne sont pas caractéristiques des dérivés nucléotidiques connus.

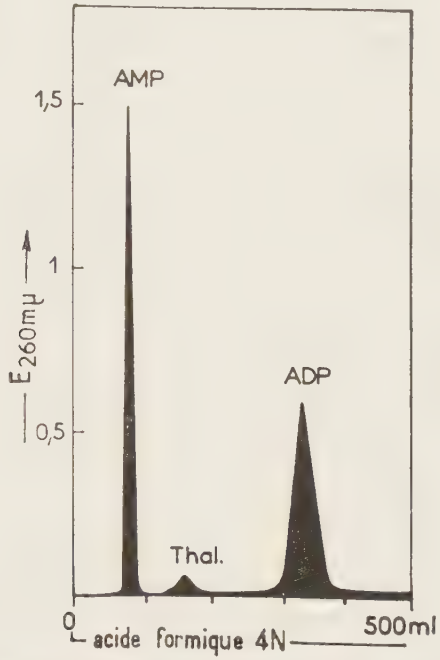


Figure 18. — *Chromatographie sur échangeur d'anions Dowex* 1 × 8 *d'un mélange d'AMP, d'ADP et de thalidomide purs.*
Solvant : acide formique 4 *N*
Ballon mélangeur : 250 *ml de capacité.*

Tableau V. — Quantités de nucléotides et de thalidomide récupérées après chromatographie sur échangeur d'anions Dowex 1 × 8.

Substance	*Mise (μmole)*	*Récupérée (μmole)*	*Perte (p.* 100*)*
AMP	2,5	2,4	4
ADP	2,5	2,3	8
Thalidomide	2,5 (o)	1,3	48

(o) *le coefficient d'absorption moléculaire du thalidomide à* $\lambda = 260$ *mμ, en milieu acide est, selon nos déterminations, égal, à* $1{,}23.10^3$.

En résumé, nous avons pu reconnaître d'une manière certaine les nucléotides libres couramment rencontrés dans les tissus végétaux, en particulier ceux dont l'évolution au cours de la germination est caractéristique.

Si nous considérons les proportions relatives des nucléotides de chaque lot, en faisant abstraction à ceux dont la présence est faible en regard des constituants principaux dans chaque fraction, les résultats rapportés dans le tableau VI permettent de faire les remarques suivantes :

1. — Les nucléotides dérivés du nicotinamide diminuent considérablement chez les germes ayant subi l'influence des drogues tératogénétiques ou mitoclasiques;

2. — les nucléosides triphosphates augmentent d'une manière générale chez ces germes;

3. — Le rapport UDPO/ATP faible chez les germes traités par la colchicine et la 6-mercaptopurine indique un ralentissement du métabolisme glucidique chez ceux-ci. Ce même rapport élevé chez les germes traités par le thalidomide montre que cette activité y est plus intense.

4. — Enfin, il est probable que certains métabolites de la 6-mercaptopurine et du thalidomide accompagnent les nucléotides libres dans l'extrait acido-soluble des germes.

ableau VI. — Répartition des nucléotides libres dans différents lots de germes de Phaseolus aufeus.

(p. 100 *par rapport aux nucléotides totaux)*

Fraction	*Constituant principal*	*Témoin*	*Colchicine*	6 *MP*	*Thalidomide*
A	NAD	13,2	4,3	2,6	5,9
B	AMP	9,3	6,9	10,4	3,8
C	NADP	4,3	9,2	3,6	—
X	« métabolite »	—	—	—	13,6
Y	« métabolite »	—	—	11,8	—
D	UMP	27,1	14,0	7,2	8,2
E	ADP	11,4	11,8	11,8	12,5
F	UDPAH (?)	5,8	3,6	1,5	6,3
G	UDPO	7,6	13,4	13,9	18,6
H	(?)	2,7	3,5	1,5	6,8
I	ATP	13,3	25,0	20,0	16,5
J	GTP, UTP	6,3	7,3	13,9	7,8
	UDPO/ATP	0,57	0,56	0,69	1,13

Chapitre IV

INFLUENCES EXERCÉES PAR LA COLCHICINE, LA 6-MERCAPTOPURINE ET LE THALIDOMIDE SUR LES GLUCIDES DES GERMES DE *PHASEOLUS AUREUS*

Nous avons vu dans le chapitre précédant que le rapport UDPO/ATP varie d'une manière significative d'un lot de germes à l'autre.

Or les variations de ces deux catégories de nucléotides reflètent l'activité métabolique qui règne dans les tissus en période de croissance. On sait, en effet, que l'intensité de la biosynthèse-glucidique correspond à une augmentation des uridines diphosphates oses, tandis que l'accroissement de la teneur en adénosine triphosphate indique une accumulation d'énergie pendant le ralentissement du métabolisme.

Par ailleurs, Dumazert et coll. (13) ont établi une corrélation entre les variations de l'UDP-glucose (constituant principal de la fraction UDPO) et celles des matières cellulosiques au cours de la germination, tandis que Marchetti (51) a dressé les courbes d'évolution parallèle des amidons et de la cellulose (Figure nº 19).

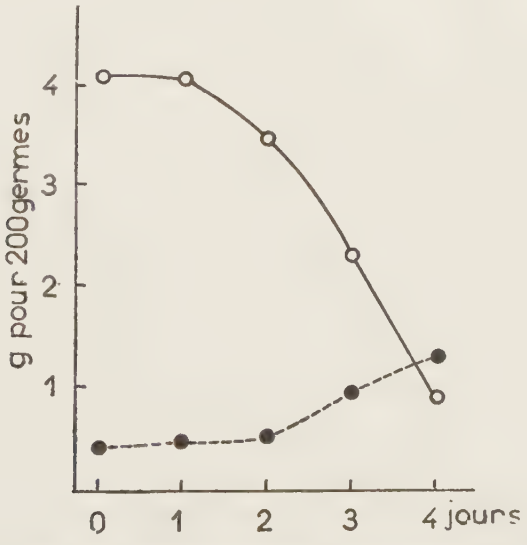


Figure 19. — *Variations concomitantes de l'amidon et de la cellulose au cours de la germination (selon Marchetti,* 30*).*

o—o—o—o : amidon

●—●--●--● : cellulose, en gr. p. 200 germes

Nous nous sommes proposé dans ce chapitre, en égard de ces observations, de déterminer les teneurs en glucides dans les germes récoltés à partir de différents milieux (physiologique, colchicine, 6-mercaptopurine, thalidomide).

Deux séries d'essais ont été menées au cours de cette expérience. Nos analyses portent sur des lots de 200 germes transformés en poudre acétonique. Les dosages sont effectués sur un gramme de cette poudre.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau VII.

Tableau VII. — Teneurs en glucides des germes de Phaseolus aureus soumis à l'action des substances tératogènes ou mitoclasiques (g pour 200 germes)

Glucides	*Témoins*	*Colchicine*	*6-MP*	*Thalidomide*
Amidons				
Essai 1	2,725	1,835	3,705	2,240
Essai 2	2,738	1,852	3,696	2,251
Moyenne	2,731	1,843	3,750	2,245
Cellulose				
Essai 1	0,828	1,455	0,534	0,970
Essai 2	0,820	1,448	0,540	1,050
Moyenne	0,824	1,451	0,537	1,010
Amidon/cellulose	3,31	1,27	6,98	2,20
Suces libres (en glucose)				
Essai 1	0,584	0,278	0,372	0,774
Essai 2	0,580	0,269	0,376	0,780
Moyenne	0,582	0,273	0,373	0,777

Notons que les teneurs en amidons, en cellulose et en sucres libres des semences sont respectivement 4,130 *g*, 0,460 *g et* 0,303 *g pour* 200 *graines (Marchetti,* 30*).*

Nous remarquons tout d'abord qu'il existe un processus de synthèse de la cellulose concomitant à celui de la dégradation de l'amidon. Les teneurs en amidons et en cellulose objectivent d'une manière remarquable les différences morphologiques et pondérales que nous avons observées dans le deuxième chapitre. Il est intéressant de noter que l'action inhibitrice de la 6-mercaptopurine sur la germination de *Phaseolus aureus* se traduit par un ralentissement important du métabolisme glucidique (rapport amidon/cellulose élevé : 6,98). L'action stimulatrice du thalidomide est matérialisée par un rapport amidon/cellulose (2,20) plus faible que celui observé chez les témoins (3,31).

Le fait que la colchicine, incorporée dans le milieu de germination, conduit à une dégradation plus rapide des amidons, concomitante à une synthèse plus intense de la cellulose, laisse supposer un épaississement de la membrane cellulaire chez les tissus des germes ayant subi l'influence de cet alcaloïde. A cet égard, la disproportion entre la teneur en cellulose (1,451 g p. 200 germes) et le poids frais des germes, par rapport à ceux déterminés chez les autres germes, est très significative.

EXAMEN D'ENSEMBLE DES RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

Il convient d'examiner les résultats obtenus au cours de nos recherches.

Nous avons tout d'abord décrit toutes les techniques analytiques en mettant l'accent sur celles qui sont délicates à mettre en œuvre. A côté des méthodes de séparation, de purification et d'identification des nucléotides libres qui sont désormais bien connues, nous avons adopté le procédé moderne de chromatographie sur couche mince de cellulose, qui nous permet d'individualiser certains nucléotides tels que le cytidine monophosphate et le nicotinamide adénine dinucléotide que la chromatographie sur papier ou sur échangeur d'ions ne peut dissocier.

Nous avons étudié ensuite les conditions d'obtention du matériel biologique : les germes de *Phaseolus aureus*. Dans l'étude de l'influence des substances mitoclasiques, antimitotiques et tératogènes sur la germination, nous avons pris comme types, respectivement la colchicine, la 6-mercaptopurine et le thalidomide en raison de leur utilisation en thérapeutique.

Nous avons déterminé la concentration optimum de chacune de ces substances qui déclanche une action macroscopiquement décelable sur les germes. Elle est de 10^{-4} pour la colchicine et de 10^{-3} pour la 6-mercaptopurine et le thalidomide.

Sur l'aspect morphologique des germes, l'action de la colchicine se traduit par une inhibition de la croissance des hypocotyles et des radicules et par une accélération du développement des tissus de la partie aérienne, ce qui confère aux germes un aspect nain. La 6-mercaptopurine par contre, n'affecte pas la croissance mais inhibe le développement rendant les germes graciles. Les radicules de ceux-ci se développent d'une manière apparemment normale. Le thalidomide à la concentration de 10^{-3}, favorise la croissance d'une manière très nette comme en témoigne la photographie des germes soumis à son influence.

Les effets sur l'aspect morphologique retentissent sur le poids frais des germes. Nous avons donc noté le poids le plus faible chez les germes obtenus à partir du milieu contenant de la 6-mercaptopurine (— 25 p. 100 par rapport aux témoins) tandis que les germes ayant subi l'influence du thalidomide ont un poids qui dépasse de 35 p. 100 le poids des germes témoins.

Abordant le problème biochimique de l'action de ces substances sur la germination, nous avons étudié la répartition des nucléotides libres dans les différents lots de germes.

Nous avons noté en premier lieu que la colchicine et la 6-mercaptopurine diminuent la teneur en nucléotides totaux tandis que le thalidomide l'augmente.

Du point de vue qualitatif, nous avons identifié d'une manière complète la plupart des nucléotides libres connus chez les germes de *Phaseolus aureus*. Nos analyses sont orientées essentiellement vers les nucléotides principaux, ceux qui interviennent dans le métabolisme intermédiaire.

Dès l'examen des diagrammes d'élution relatifs à la répartition des nucléotides libres et autres composés acido-solubles, une constatation s'impose : les antimétabolites que nous avons expérimentés ont pour effet une diminution quasi-générale des nucléotides émergeant très tôt de la colonne de résine échangeuse d'anions et une augmentation des fractions terminales, en particulier de l'adénosine triphosphate et de l'uridine diphosphate-oses.

L'action de la colchicine se traduit par une activation du métabolisme des acides nucléiques et des protéines, avec une sensibilité particulière pour les cellules en cours de division (Fursov). L'alcaloïde agirait, en petite quantité, comme une hormone activant la phosphorylation des oses et la biosynthèse des polysaccharides (glucosanes, pentosanes) (Salama et coll.) Ces remarques sont intéressantes à souligner car nous avons trouvé chez les germes ayant subi l'influence de la colchicine (à la concentration de 10^{-4}), une élévation de la teneur en uridine-diphosphate-oses (UDPO) et en adénosine triphosphate (ATP) (respectivement 13,4 et 25 p. 100 contre 7,6 et 13,3 chez les témoins). Néanmoins, le rapport UDPO/ATP reste sensiblement identique à celui observé chez les témoins. Il est probable qu'à ce stade de germination, on observe bien une quantité notable de la forme active des oses, mais celle-ci ne serait pas utilisée pour la synthèse des polysaccharides, en particulier de la cellulose, soit par une stabilisation de l'activité métabolique dans la cellule, dont la paroi se trouve épaissie, soit par une inhibition du processus enzymatique de transglucosylation. La disproportion entre le poids frais des germes et le poids de cellulose déterminés chez ces germes, comparés à ceux des témoins, est significative à cet égard.

La 6-mercaptopurine se comporte comme un antagoniste de la purine. Elle interfère, avec une remarquable facilité, avec les restes puriques, soit dans la formation de quelques coenzymes essentiels contenant les bases puriques, soit dans la synthèse des acides nucléiques. Nos résultats confirment cette notion. Nous avons trouvé, en effet, une quantité notable (12 p. 100 des nucléotides totaux) d'une substance non nucléotidique ayant le même comportement chromatographique que la 6-mercaptopurine. Faute de pouvoir identifier d'une manière complète et certaine, nous l'appelons « métabolite » de la 6-MP. Nos analyses révèlent en outre une accumulation des nucléosides puriques triphosphates (ATP et GTP); ces derniers, ayant subi l'interférence de l'antimétabolite, ne seraient pas utilisés pour la synthèse nucléique et protéique.

En ce qui concerne l'influence du thalidomide (à la concentration de 10^{-3}), sur les nucléotides libres, le fait le plus marquant est certainement le taux élevé des UDPO et surtout l'augmentation du rapport UDPO/ATP (1,13 contre 0,57 pour les germes témoins). Il indique une intensité accrue du métabolisme glucidique, qui se traduit par une dégradation active des réserves amylacées, par une synthèse rapide des matières cellulosiques et enfin par une présence prépondérante des sucres libres.

Autre fait caractéristique à signaler : l'effondrement des nucléotides de la nicotinamide (NAD et NADP) chez les germes traités par le thalidomide. Ceci est en accord avec les observations de Madame Oustrin selon lesquelles l'amide nicotinique (élément constitutif de ces nucléotides) agit comme un antagoniste du thalidomide.

Nous avons noté, enfin, parmi les composés acido-solubles des germes ayant subi l'influence de ce médicament, l'existence d'une substance dont le comportement chromatographique et spectrophotométrique laisse penser à un des métabolites de ce dernier.

Si nous considerons les résultats fournis par l'ensemble de ces expériences nous remarquons que lorsque les semences de *Phaseolus aureus* sont soumises à l'action de la colchicine, de la 6-mercaptopurine et du thalidomide pendant la germination :

— les taux du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et de l'uridine monophosphate (UMP) diminuent fortement;

— les teneurs en UDPO et en ATP augmentent très sensiblement

— le rapport amidon/cellulose s'écarte de celui déterminé chez les témoins.

Bien que nous n'ayons pas assez de recul pour généraliser le phénomène, compte tenu de ces observations, il est permis de penser qu'on pourrait préconiser un test d'étude des actions secondaires, et en particulier de l'action tératogénétique, de certains médicaments chimiques. Ce test consisterait à étudier les variations de certains nucléotides chez les germes de *Phaseolus aureus* ou d'une façon plus simple et dans un but d'orientation, les variations des teneurs en amidons et en cellulose et plus particulièrement le rapport de ces deux polysaccharides.

En résumé :

Nous avons étudié l'influence exercée par la colchicine, la 6-mercap topurine et le thalidomide sur la germination de *Phaseolus aureus*.

Les deux premiers exercent une action inhibitrice sur la croissance tandis que le troisième a un effet inverse à une concentration bien déterminée.

La répartition des nucléotides libres subit une variation très sensible. Nous avons noté dans l'ensemble une nette diminution des nucléotides de la nicotinamide et de l'uridine monophosphate, une augmentation des uridine-diphosphate oses et de l'adénosine triphosphate.

Le rapport amidon/cellulose s'écarte sensiblement de celui déterminé chez les germes obtenus dans les conditions physiologiques.

Partant de ces résultats nous avons proposé un test d'étude des effets secondaires de certains médicaments chimiques, plus particulièrement leur éventuelle action tératogène.

Lu et approuvé

Le Président du Jury
Professeur J.C. Dumazert

Vu et approuvé

Pour le Doyen, L'assesseur
Professeur Ch. Grebus

Vu et Permis d'imprimer

Aix, le 5 Juin 1967.

Pour le Recteur,
Pour le Président du Conseil de l'Université
Le Vice-Président,
B. Guyon.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Albaum H.G. *The Biology of Phosphorus.* Michigan State College Press. (1952) p. 37.
2. Beckman R. *Arzeim-Forsch.*, (1963), (*13*), 185.
3. Bergwist R. *Acta Chimica Scand.* (1956), *10*, 1303.
4. Boney A.D. *Nature* (1963), *198*, 1068.
5. Brent R.L. J. *Pediatrics* (1964), *64*, 762.
6. Briggs A.P. J., *Biol. Chem.* (1922), *53*, 13.
7. Brown E.G. *Biochem. J.* (1962), *85*, 633.
8. Charraborty A., Biswas B.B. *Bull. Botan. Soc. Bengal* (1964), *18*, (1-2) 214.
9. Damon, *Proc. Okla. Acad. Scien.* (1957), *38*, 9.
10. Delatour P., Dams R., Favre-Tissot M. *Thérapie* (1965), *20* 573.
11. Derman H., Diller J.D. *Forest. Sci.* (1962), *8*, 43.
12. Dumazert C., C.R. *Soc. Biol.* (1933) *113*, 106.
13. Dumazert C., Vovan L., Marchetti R., C.R. *Soc. Biol.* (1963), *47*, 576.
14. Dumazert C., Vovan L., Marchetti R. *Bull. Soc. Pharm.* Marseille, (1964), *50*, 151.
15. Dustin, Cité par E. Huant. Les traitements mitotiques du cancer. G. Doin et Cie Edt.
16. Elion G.B., Balis M.E., *Fed. Proc.* (1955), *14*, 207.
17. Elion G.B., Hitching G.H., in Ciba Foundation symposium on the chemistry and biology of Purines. J. & A. Churchill. Ltd. London. (1957) p. 286.
18. Fabro S., Schumacher H., Smith R.L., Williams R.T. *Nature* (1964) *201*, 1125.
19. Franck O., Barber H., Ziffer H., Aaronson S., *Science* (1963) *139*, 110.
20. Friedkin M., *Biochem. Biophys. Acta* (1955), *18*, 447.
21. Fursov V.I., Autenshylus A.I., Vestn. Sel'skokhoz Nauk. Min. Sel'k. Khoz. Kaz. SSSR. (1964) *7* (5), 32.
22. Giacomello G., Malatesta P., Quaglia G., *Nature* (1964), *201*, 940.
23. Ginsburg V., Stumpf P.K., Hassid W.A., *J. Biol. Chem.* (1956), *233*, 977.

24. Gregoire J., Gregoire J., Limozin N.; *Bull. Soc. Chim. Biol;* (1958), *40*, 767.
25. Hagedorn H.C., Jensen B.N., *Bioch. Z.* (1923), *135*, 46.
26. Halder L.E., Hall I.V., *Can. J. Plant. Sci.* (1963), *43*, 107.
27. Hurlbert R.B., Schmitz H., Brumm A.F., Potter V.R. *J. Biol. Chem.* (1954), *209*, 29.
28. Mc Kenzie, Mc Groth., *Proc. Soc. Exp. Biol.* (1962), *109*, 511.
29. Mandel P., Harth S., *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1961), *43*, 969.
30. Marchetti R. Thèse Doct. Pharm. univ. Marseille 1964, Lino-Imp. Marseille.
31. Mejbaum W.Z. *physiol. Chem.* Hoppe-Seyler's (1934), *28*, 988.
32. Mergen F., Lester D.T., *Forest Sci.* (1961), *7*, 314.
33. Mori K., Nakamura M., Funahashi S., *Bull. agr. Chem. Soc.* Japan. (1960), *24*, 344.
34. Naguib M.I., Salama A.M., *Arch. Mikrobiol.* (1964), *48*, 222.
35. Oustrin M.L., *Toulouse Pharmaceutique* (1966), *13*, 60.
36. Panuccio P. *Arch. Ital. patol. e clin. tumori.* (1958), *2*, 1276.
37. Partridge S.M., *Nature* (1949), *164*, 443.
38. Parups E.V., Hoffmann I. *Nature* (1965), *205*, 1242.
39. Rowan K.S. *J. Exp. Bot.* (1957), *8*, 256.
40. Salama A,M., Naguib M.I. *Arch. Mikrobiol.* (1963), *46*, 296.
41. Sebesta K., Sorm F., *Czechoslov. Chem. Commun.* (1959), *24*, 2781.
42. Sen N.K., Vidyabhusan R.V., *Euphytica* (1960), *9*, 317.
43. Simantel G.M., Ross J.G., Huang C.C., Haensel H.D., *J. Heredity* (1963), *54*, 221.
44. Skipper H.E., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1954), *60*, 315.
45. Simantel G.M., Ross J.G., *J. Heredity* (1964), *55*, 3.
46. Smith I. Chromatography and Electrophoretic techniques. Williams Heinheman. Medical Books LTB-London.
47. Smith R.L., Williams R.A.D., Williams R.T. *Life Sciences* (1962), *7*, 333.
48. Vovan L. Thèse Doct. es Sci. Marseille 1964, Lino-Imp.
49. Wang D.Y., Greenbaum A.L., Harkness R.D. *Biochem, J. 86* 62.
50. Weinfeld H., Sandberg A.A., *Biochem. Pharmacol*, (1964), *13*, 1627.
51. Zunin C., Borrone C., *Minerva Pediatr.* (1955), *7*, 66.

Imprimerie Nationale de Monaco S.A.